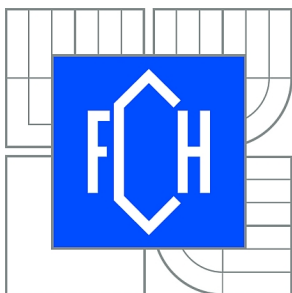




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

TESTOVÁNÍ MOŽNOSTÍ ENKAPSULACE VYBRANÝCH DRUHŮ MAKROMOLEKUL A BAKTERIÍ

POSSIBILITIES OF ENCAPSULATION OF PARTICULAR TYPES OF MACROMOLECULES AND
BACTERIA

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. JIŘÍ KAPAR

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2013



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0744/2012	Akademický rok: 2012/2013
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Jiří Kapar	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Andrea Lichnová	

Název diplomové práce:

Testování možností enkapsulace vybraných druhů makromolekul a bakterií

Zadání diplomové práce:

1. Rešerše - přehled technik enkapsulace, možnosti enkapsulace velkých polymerních molekul a mikroorganismů.
2. Optimalizace metod kultivace vybraných typů mléčných bakterií a jejich enkapsulace.
3. Optimalizace analýzy aktivity enkapsulovaných enzymů.
4. Experimentální studie - sledování enkapsulační účinnosti, stability částic a zachování aktivity enkapsulovaných systémů v různém prostředí.

Termín odevzdání diplomové práce: 3.5.2013

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Jiří Kapar
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na testování možností enkapsulace enzymů a probiotických bakterií. V teoretické části jsou shrnuty enkapsulační techniky používané v potravinářském průmyslu. Dále jsou popsány materiály pro enkapsulaci, především polysacharidové povahy. V dalších kapitolách teoretické části jsou diskutovány některé postupy enkapsulace biopolymerů a mikroorganismů se zaměřením na enzymy a probiotické kultury.

V experimentální části jsou uvedeny postupy přípravy řady typů částic na bázi polysacharidů a liposomů. Částice byly použity pro enkapsulaci vybraných hydrolytických enzymů a probiotických kmenů *Bifidobacterium breve* a *Lactobacillus acidophilus*. Mezi skupinové parametry pro posouzení enkapsulační účinnosti enzymů bylo zařazeno stanovení bílkovin a enzymové aktivity. Dále byla sledována velikost částic a jejich stabilita ve vodném prostředí, ve vybraných modelových potravinách a v modelových tělních tekutinách. V práci bylo zjištěno, že enkapsulace enzymů do polysacharidových částic byla účinná téměř u všech typů částic více než z 50 %. Polysacharidové částice vykazovaly velmi dobrou stabilitu v tělních tekutinách i v modelových potravinách. Jako nejvhodnější částice pro enkapsulaci enzymů se osvědčily chitosanové částice a liposomy. Při enkapsulaci mikroorganismů byly použity polysacharidové částice, stabilita těchto částic byla podobná jako u částic použitých k enkapsulaci enzymů. Částice s mikroorganismy vykazovaly rovněž velmi dobrou stabilitu v modelových potravinách i v modelových tělních tekutinách.

Enkapsulace umožňuje dlouhodobou stabilizaci biologicky aktivních látek a možnost jejich transportu a řízeného uvolnění v trávicí soustavě. Enkapsulace probiotických mikroorganismů umožňuje udržení jejich viability po dobu expirace produktu. Enkapsulace je tedy jednou z perspektivních metod pro produkci kvalitních potravin a potravinových doplňků s vysokou přidanou hodnotou.

KLÍČOVÁ SLOVA

Enkapsulace, částice, proteolytické enzymy, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, průtoková cytometrie, analytická centrifugace, dynamický rozptyl světla

ABSTRACT

Presented diploma thesis is focused on testing encapsulation methods of enzymes and probiotic bacteria. In the theoretical part a summary of different encapsulation techniques used in food industry is given. Further, materials for encapsulation, above all polysaccharides are presented. Next, some procedures of encapsulation of biopolymers and microorganisms – mainly enzymes and probiotic cultures are discussed.

In the experimental part methods for preparation of several types of particles based on polysaccharides and liposomes are introduced. Particles were used for encapsulation of selected hydrolytic enzymes and probiotic strains *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus acidophilus*. The encapsulation effectiveness was evaluated by analysis of total proteins and enzyme activities. Particles sizes and their stability in water, in selected model foods and model body fluids were observed, too.

According to results obtained in this work it was found that encapsulation of enzymes into polysaccharide particles were successful in all types of particles (encapsulation effectiveness was more than 50 %). Polysaccharide particles showed a very good stability in body fluids as well as in model foods. As the most suitable materials for enzymes encapsulation chitosan and liposomes were found. Polysaccharide particles were used also for the encapsulation of microorganisms. The stability of particles with lactic acid bacteria was similar to particles containing enzymes, very good stability was verified also in model foods and model body fluids.

Encapsulation enables long-term stabilization of biologically active compounds as well as possibility of their transport and controlled releasing in gastrointestinal tract. Encapsulation of probiotic bacteria could preserve their viability and long-term survival until the product expiration date. Thus, encapsulation is one of the most promising procedures for production of foods and food supplements of great quality and high additional value.

KEYWORDS

Encapsulation, particles, proteolytic enzymes, *Bifidobacter breve*, *Lactobacillus acidophilus*, flow cytometry, analytical centrifugation, dynamic light scattering

KAPAR, J. *Testování možnosti enkapsulace vybraných druhů makromolekul a bakterií*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 93 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem citoval správně a úplně. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Rád bych poděkoval paní doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za ochotu, laskavost, odborné a cenné rady, které mi usnadnily vypracování této diplomové práce. Dále bych rád poděkoval doktorandce Ing. Petře Matouškové za pomoc při měření experimentální části práce.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Techniky enkapsulace	10
2.1.1	Sprejové sušení	11
2.1.2	Sprejové chlazení	12
2.1.3	Vytlačování a vstřikování taveniny	12
2.1.4	Emulgace	12
2.1.5	Fluidní vrstva	13
2.1.6	Lyofilizace	13
2.1.7	Koacervace	13
2.1.8	Uzavření (entrapment) do liposomů	14
2.1.9	Kokrystalizace	14
2.2	Vnější fáze používané pro enkapsulaci	14
2.2.1	Polysacharidové látky	15
2.2.1.1	Alginát	15
2.2.1.2	Chitosan	15
2.2.1.3	Agar	16
2.2.1.4	Agarosa	16
2.2.1.5	Škrob	17
2.2.1.6	Celulosa	17
2.2.1.7	κ -karagenan	17
2.2.1.8	Pullulan	18
2.2.2	Ostatní látky použitelné k enkapsulaci	18
2.2.2.1	Želatina	18
2.2.2.2	Syrovátkové proteiny	19
2.2.2.3	Lecithin	19
2.2.2.4	Cholesterol	19
2.2.2.5	Polyvinylalkohol (PVA)	19
2.3	Enkapsulace velkých polymerních molekul a mikroorganismů	20
2.3.1	Imobilizace enzymů	21
2.3.1.1	Adsorpce	21
2.3.1.2	Iontová vazba	21
2.3.1.3	Kovalentní vazba na nerozpustný nosič	21
2.3.1.4	Polymerace enzymů do gelu matrice	22
2.3.1.5	Mikroenkapsulace	22
2.3.1.6	Proteolytické enzymy	22
2.3.2	Imobilizace mikroorganismů	23
2.3.3	Probiotika	23
2.3.3.1	Rod <i>Lactobacillus</i>	24
2.3.3.2	Rod <i>Bifidobacterium</i>	24
2.4	Metody využívané k analýze částic	24
2.4.1	Stanovení distribuce velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla ..	24
2.4.2	Stanovení stability koloidního systému pomocí zeta potenciálu	25

2.4.3	Analytická centrifugace	27
2.4.4	Průtoková cytometrie	28
3	CÍLE PRÁCE	30
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1	Použité chemikálie a přístroje	31
4.1.1	Chemikálie	31
4.1.2	Přístroje	31
4.2	Použité enzymy a mikroorganismy	32
4.2.1	Enzymy	32
4.2.2	Použité mikroorganismy	32
4.3	Příprava částic	32
4.3.1	Příprava částic pro enkapsulaci enzymů	32
4.3.1.1	Příprava chitosanových částic	32
4.3.1.2	Příprava chitosan-alginátových částic	32
4.3.1.3	Příprava alginátových částic	33
4.3.1.4	Příprava škrobových částic	33
4.3.1.5	Příprava liposomových částic	33
4.3.2	Příprava částic pro enkapsulaci mikroorganismů	33
4.3.2.1	Příprava alginátových částic	33
4.3.2.2	Příprava chitosanových částic	33
4.3.2.3	Příprava chitosan-alginátových částic	33
4.3.2.4	Příprava agarosových částic	34
4.3.2.5	Příprava agarových částic	34
4.3.2.6	Příprava alginát-agarosových částic	34
4.3.2.7	Příprava alginát-agarových částic	34
4.3.2.8	Příprava alginát-škrobových částic	34
4.3.2.9	Příprava alginát-pululanových částic	34
4.4	Stanovení enkapsulační účinnosti	34
4.4.1	Stanovení enkapsulační účinnosti u enkapsulovaných enzymů	34
4.4.1.1	Stanovení koncentrace bílkovin Hartree-Lowryho metodou	34
4.4.1.2	Stanovení kalibrační křivky albuminu	35
4.4.1.3	Stanovení enzymových aktivit	35
4.5	Stanovení velikosti částic	35
4.6	Stanovení stability částic	36
4.7	Stanovení stability částic v modelových tělních tekutinách	36
4.7.1	Složení modelové pankreatické šťávy	36
4.7.2	Složení modelové žaludeční šťávy	36
4.7.3	Složení modelové žlučové šťávy	36
4.8	Stanovení stability částic v simulovaných potravinách	36
4.9	Stanovení vlastností pomocí analytické centrifugace	36
4.10	Kultivace mikroorganismů	37
4.11	Stanovení viability a počtu buněk pomocí průtokové cytometrie	37
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	38
5.1	Vizualizace částic pomocí optického mikroskopu	38
5.2	Enkapsulace enzymů	38
5.2.1	Stanovení enkapsulační účinnosti pomocí stanovení koncentrace bílkovin	38

5.2.1.1	Enkapsulační účinnost u chitosanových částic	38
5.2.1.2	Enkapsulační účinnost u chitosan-alginátových částic	39
5.2.1.3	Enkapsulační účinnost u alginátových částic	40
5.2.1.4	Enkapsulační účinnost u škrobových částic	40
5.2.1.5	Enkapsulační účinnost u liposomových částic	41
5.2.1.6	Srovnání enkapsulační účinnosti v rámci všech částic	41
5.2.2	Stanovení enkapsulační účinnosti pomocí enzymové aktivity	42
5.2.2.1	Enkapsulační účinnost u chitosanových částic	43
5.2.2.2	Enkapsulační účinnost u chitosan-alginátových částic	43
5.2.2.3	Enkapsulační účinnost u alginátových částic	44
5.2.2.4	Enkapsulační účinnost u škrobových částic	45
5.2.2.5	Enkapsulační účinnost u liposomových částic	45
5.2.2.6	Srovnání enkapsulační účinnosti enzymů u všech typů částic	46
5.2.3	Stanovení velikosti částic u enkapsulovaných enzymů	47
5.2.4	Stanovení stability částic	50
5.2.5	Stanovení stability částic v tělních tekutinách pomocí koncentrace bílkovin	51
5.2.5.1	Stanovení stability částic v žaludeční šťávě	51
5.2.5.2	Stanovení stability částic v modelové pankreatické šťávě	52
5.2.5.3	Stanovení stability částic ve žlučové šťávě	52
5.2.6	Stanovení stability částic v tělních tekutinách pomocí zeta potenciálu	53
5.2.6.1	Stanovení stability u chitosanových částic	53
5.2.6.2	Stanovení stability u alginátových částic	53
5.2.6.3	Stanovení stability částic u liposomových částic	54
5.2.6.4	Stanovení stability u škrobových částic	55
5.2.7	Stanovení stability částic s enkapsulovnými enzymy v simulovaných potravinách	55
5.2.7.1	Stabilita chitosanových částic v simulovaných potravinách	55
5.2.7.2	Stabilita alginátových částic v simulovaných potravinách	56
5.2.7.3	Stabilita liposomových částic v simulovaných potravinách	56
5.2.7.4	Stabilita škrobových částic v simulovaných potravinách	57
5.2.8	Stanovení vlastností částic pomocí analytické centrifugace	57
5.2.8.1	Stanovení vlastností u chitosanových částic	59
5.2.8.2	Stanovení vlastností u chitosan-alginátových částic	60
5.2.8.3	Stanovení vlastností u alginátových částic	61
5.2.8.4	Stanovení vlastností u liposomových částic	62
5.2.8.5	Stanovení vlastností u škrobových částic	63
5.3	Enkapsulace mikroorganismů	63
5.3.1	Stanovení stability částic v tělních tekutinách	65
5.3.2	Stanovení stability částic v modelových potravinách	66
5.3.3	Stanovení stability částic v kultivačním médiu	68
5.3.4	Stanovení viability buněk pomocí průtokové cytometrie	71
5.3.5	Stanovení viability enkapsulovaných buněk pomocí fluorescenční mikroskopie	73
5.3.6	Stanovení stability lyofilizovaných částic	74
6	ZÁVĚR	76
7	POUŽITÁ LITERATURA	78

8	SEZNAM PŘÍLOH	86
9	PŘÍLOHY	87

1 ÚVOD

Zapouzdření neboli enkapsulace může být definována jako zachycení jedné látky uvnitř druhé látky, čímž vytvoříme částice o průměru několika nanometrů až milimetrů. Látka, která je enkapsulována se může nazývat jako účinná látka, jaderný materiál, výplň či vnitřní fáze. Látka, která umožňuje zapouzdření, může být nazvána jako matrice, vnější fáze, nosič, kapsle, skořápka, povlak či membrána [1], [2].

V potravinářském průmyslu můžeme enkapsulaci použít z mnoha důvodů. Enkapsulace je užitečným nástrojem pro zlepšení přenosu bioaktivních molekul (např. vitamíny, antioxidanty, minerály, fytoosteroly, lutein, mastné kyseliny, lykopen) a živých buněk (např. probiotika) do potravin [1], [3]. Enkapsulace je technologie, při které obalová látka bioaktivní komponentu obklopí, pokryje a chrání pomocí bariéry. Dále je enkapsulace definována jako technologie balení pevných, kapalných nebo plyných látek do malých kapslí, které uvolňují svůj obsah kontrolovatelnou rychlostí za specifických podmínek [4].

V posledních letech jsou do potravin a doplňků za účelem zvýšení jejich kvality a nutriční hodnoty stále častěji přidávány různé typy funkčních sloučenin. Tyto sloučeniny jsou většinou velmi citlivé na vnější prostředí nebo zpracování, a proto je proces enkapsulace stále více řešeným tématem v oblasti potravinářství. Funkční sloučeniny se používají k regulaci chuti, barvy, textury nebo k uchování žádoucích vlastností. Bioaktivní molekuly s různými potenciálními zdravotními přínosy mohou být rovněž enkapsulovány do různých typů částic. Zapouzdření těchto bioaktivních molekul zajišťuje zachování stability během zpracování a skladování, též z důvodu ochrany před nežádoucími reakcemi bioaktivních molekul s potravinovou matricí potravin. Některé bioaktivní molekuly se vyznačují velmi rapidní inaktivací či změnou vlastností (hydrolýza, oxidace). Enkapsulace umožňuje zpomalení těchto nežádoucích procesů.

Kromě výše uvedených důvodů enkapsulace může sloužit k úpravě fyzikálních vlastností původního materiálu za účelem snadnější manipulace nebo oddělení látek ve směsi, které by mohly spolu navzájem reagovat, případně pro zajištění dostatečné koncentrace a homogenní dispergace aktivní látky [4], [5].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Techniky enkapsulace

Mnoho enkapsulačních technik je založeno na tvorbě kapek aktivní látky (v plynné, kapalně nebo práškové formě) a tyto kapičky jsou následně obklopeny nosným materiálem v plynu nebo kapalně fázi pomocí různých fyzikálně-chemických procesů [6].

Tab. 1 Přehled běžných enkapsulačních procesů [4]

No	Microencapsulation technique	Major steps in encapsulation
1	Spray-drying	a. Preparation of the dispersion b. Homogenization of the dispersion c. Atomization of the infeed dispersion d. Dehydration of the atomized particles
2	Spray-cooling	a. Preparation of the dispersion b. Homogenization of the dispersion c. Atomization of the infeed dispersion
3	Spray-chilling	a. Preparation of the dispersion b. Homogenization of the dispersion c. Atomization of the infeed dispersion
4	Fluidized-bed coating	a. Preparation of coating solution b. Fluidization of core particles. c. Coating of core particles
5	Extrusion	a. Preparation of molten coating solution b. Dispersion of core into molten polymer c. Cooling or passing of core-coat mixture through dehydrating liquid
6	Centrifugal extrusion	a. Preparation of core solution b. Preparation of coating material solution c. Co-extrusion of core and coat solution through nozzles
7	Lyophilization	a. Mixing of core in a coating solution b. Freeze-drying of the mixture
8	Coacervation	a. Formation of a three-immiscible chemical phases b. Deposition of the coating c. Solidification of the coating
9	Centrifugal suspension separation	a. Mixing of core in a coating material b. Pour the mixture over a rotating disc to obtain encapsulated tiny particles c. Drying
10	Cocrystallization	a. Preparation of supersaturated sucrose solution b. Adding of core into supersaturated solution c. Emission of substantial heat after solution reaches the sucrose crystallization temperature

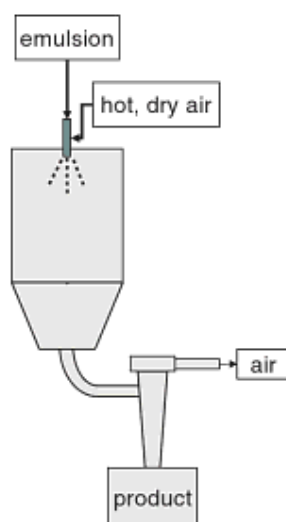
No	Microencapsulation technique	Major steps in encapsulation
11	Liposome entrapment	a. Microfluidization b. Ultrasonication c. Reverse-phase evaporation
12	Inclusion complexation	Preparation of complexes by mixing or grinding or spray-drying

2.1.1 Sprejové sušení

Sprejové sušení je jedním z nejstarších procesů enkapsulace aktivních látek. Tato metoda je tak běžná v potravinářství, že není vnímána jako enkapsulace. Sprejové sušení aktivních látek je dosaženo rozpuštěním, emulgací nebo disperzí aktivní látky v nosiči, dále následuje atomizace a sprejování směsi do horké komory. Během tohoto procesu dochází k tvorbě filmu na povrchu kapek [4].

Sprejové sušičky jsou v potravinářském průmyslu vybaveny pro rozprašování vysokotlakými tryskami nebo odstředivými koly, někdy nazývanými rotační rozprašovače pracující za současného průtoku vzduchu a částic tak, aby docházelo k minimálnímu přehřátí částic. K přehřátí by nemělo docházet u těch částic, které obsahují teplotně sensitivní látky. Částice vytvořené za současného průtoku vzduchu a materiálu jsou pravděpodobně více porézní než ty, které jsou připravené za opačné podmínky. Velikost rozprašovaných kapiček závisí na povrchovém napětí a viskozitě kapaliny, na ztrátách tlaku v tryskách a rychlosti sprejování. Velikost kapiček určuje také dobu sušení a velikost částic. Kontrolou vstupní teploty (150-220 °C), průtoku a dalších základních parametrů by mělo být zajištěno, že teplota kapičky nebude nikdy vyšší než 100 °C. Tato teplota by měla zajišťovat, že výstupní teplota bude v rozmezí 50-80 °C. Větší sprejové sušárny a tím delší doba zdržení kapek v sušárně (5-100 sekund) umožňuje sušení částic větších velikostí. Rozprašovací trysky se obvykle montují tak, aby sprejovaly shora dolů, případně zdola nahoru jako fontána [4].

Během sušicího procesu se film tvoří kolem kapky a koncentrace látky v kapce během sušení stoupá. Nakonec dojde k vytvoření suché částice [6].



Obr. 1 Schéma sprejové sušárny [6]

2.1.2 Sprejové chlazení

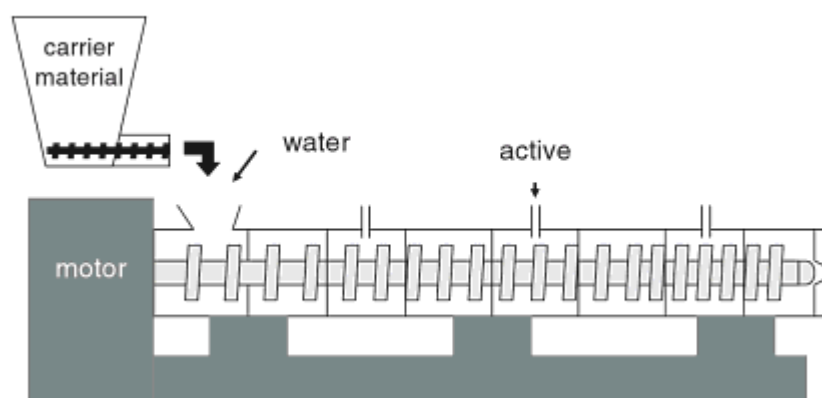
Sprejové chlazení je další technologie na výrobu částic, kde máme aktivní látky pokryté lipidem. Aktivní látka může být rozpuštěna v lipidech, může být přítomna jako suchá částice nebo ve vodné emulzi [4]. Kapičky roztaveného lipidu jsou vstřikovány pomocí trysek do chladicí komory, což má za následek tuhnutí lipidů a vytvoření částic. Tato metoda je velmi podobná se sprejovému sušení, ale při nízké teplotě nedochází k odpařování vody. Rotační disk je další atomizační metoda pro přípravu pevných lipidických částic [6].

2.1.3 Vytlačování a vstřikování taveniny

Sacharidové materiály mohou být smíchány s aktivní látkou při teplotách nad 100 °C, poté protlačovány přes otvory do skleněné formy, ve které má aktivní látka relativně malou pohyblivost. Obecně lze rozlišit dva typy enkapsulace aktivních látek do sacharidických materiálů [4], [6].

První z těchto dvou typů je vstřikování taveniny, ve které tavenina (složená ze sacharózy, maltodextrinu, glukozového sirupu, polyolů, a/nebo dalších mono- a disacharidů) je protlačována přes jeden nebo více otvorů a poté dochází ke zchlazení chladným prostředím, případně dehydratací rozpouštědlem. Obecně se používá isopropanol a tekutý dusík jako dehydratační rozpouštědlo. Obalový materiál (nosič) ztvdne při kontaktu s rozpouštědlem a tím dochází k enkapsulaci aktivní látky. Velikost extrudovaných pramenů je snížena na odpovídající rozměr uvnitř studeného rozpouštědla za intenzivního míchání, čímž dochází k rozbití extrudátů na malé kousky. Zbytky aktivní látky jsou odstraněny pomocí dehydratačního rozpouštědla. Částice vytvořené touto metodou jsou ve vodě rozpustné a jejich velikost se pohybuje od 200 do 2000 μm [6].

Zapouzdření do sacharidové taveniny může být dosaženo při použití extrudéru s jedním nebo více šrouby v kontinuálním procesu. Tento proces se nazývá vytlačování taveniny a je velmi podobný předchozí metodě. Hlavní rozdíl je v tom, že tato metoda využívá šrouby ve vodorovné poloze a povrch extrudátů není promýván. Extrudéry jsou termomechanické mixéry, které se skládají z jednoho nebo více šroubů. Extrudáty mohou být složeny ze škrobu, maltodextrinů, modifikovaných škrobů, cukrů, celulóзовých etherů [6].



Obr. 2 Schéma extrudéru [6]

2.1.4 Emulgace

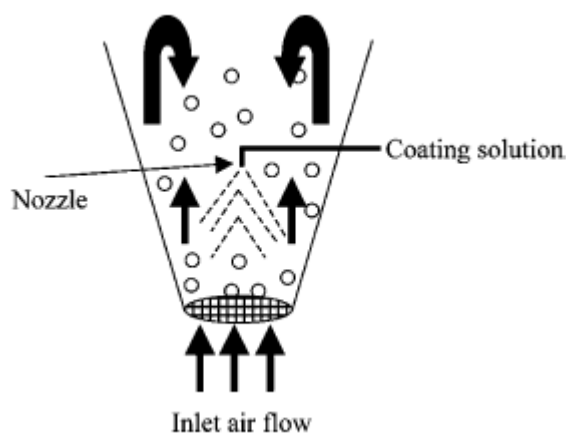
Další často využívanou technikou je emulgace. Tato metoda se využívá v případě ve vodě rozpustných aktivních látek. Rozeznáváme dvě kombinace emulzí. První z nich je emulze voda v oleji, druhá je olej ve vodě. Speciální emulzí je dvojitá emulze voda/olej/voda. Emulze

olej ve vodě může být sušena různými sušícími metodami jako je např. sprejové sušení za vytvoření prášku [1].

2.1.5 Fluidní vrstva

Původně byla tato metoda vyvinuta pro farmaceutický průmysl. V poslední době se uplatňuje čím dál více i v potravinářském průmyslu. Aktivní látka je suspendována v komoře s řízenou teplotou a vlhkostí, za vysoké rychlosti dochází k atomizaci vnější fáze a tím dochází k obklopení aktivní látky vnější fází a k vytvoření částic [7], [8]

Vnějších fází použitelných při tomto typu přípravy je velké množství. Používají se deriváty celulózy, dextransy, lipidy, proteinové deriváty, deriváty škrobu a další. Tato metoda je použitelná též pro tavné povlaky, jako je hydrogenovaný rostlinný olej, mastné kyseliny, emulgátory, vosky, nebo můžeme využít škrob, maltodextrin apod. Mnoho obohacených potravin, potravinových směsí a suchých směsí obsahuje fluidně enkapsulované látky. Touto metodou se enkapsuluje například hydrogenuhličitan sodný přidávaný do pečiva nebo sůl přidávaná do masa [9], [10].



Obr. 3 Schéma tvorby částic pomocí fluidní vrstvy [4]

2.1.6 Lyofilizace

Lyofilizace neboli sublimační sušení je proces, který slouží k dehydrataci téměř všech tepelně sensitivních materiálů a aromatických látek. Tato metoda byla použita k zapouzdření ve vodě rozpustných esencí a přírodních aromat. Až na zdlouhavé sublimační sušení (obvykle 20 hod) je lyofilizace jednoduchá technika [11].

2.1.7 Koacervace

Koacervace je metoda, při které dochází k rozdělení polymerního roztoku na dvě nemísitelné kapalně fáze, z nichž jedna bohatá na makromolekulární materiál se označuje jako koacervační fáze, a druhá, zředěná, se nazývá koacervační médium neboli supernatant. Koacervace se dělí podle mechanismu na jednoduchou a komplexní koacervaci. Jednoduchá koacervace je děj, kdy fázová separace nastává v přítomnosti jednoho typu makromolekulární látky na rozdíl od komplexní koacervace, která probíhá v přítomnosti dvou a více opačně nabitých polymerů. Během jednoduché i komplexní koacervace se vytváří drobné kapky, které se usazují nebo spojují a vytváří oddělenou koacervovanou fázi. Pokud jsou v roztoku přítomna jádra, kapky koacervátu se kolem nich hromadí a po přidání vhodného síťovacího činidla vytváří stěnu koacervátů. Mícháním roztoku se může předejít shlukování

a sedimentaci kapek koacervátu. V některých případech je nezbytný přídavek stabilizátoru, aby nedocházelo ke koagulaci výsledných mikročástic. Tvorba mikročástic koacervací obvykle vyžaduje další kroky pro jejich zpevnění. Těmi mohou být relativně jednoduché procesy vedoucí k odstranění zbytkového rozpouštědla, např. snížení teploty a propláchnutí srážecím roztokem nebo stabilizace síťovacími činidly [12].

2.1.8 Uzavření (entrapment) do liposomů

Liposomy jsou uměle připravované biomembrány, které se skládají z fosfolipidů, nejčastěji lecitinu a cholesterolu. Pokud je lecitin dispergován ve vodě, liposomy se tvoří spontánně. Liposomy obsahují dvojvrstvu s hydrofobními řetězci, které směřují do středu molekuly a s hydrofilními hlavičkami, které směřují do prostředí. Do těchto typů částic lze zapouzdřit látky jak hydrofilní, tak lipofilní ve vodném prostředí. Byly použity pro přenos vakcín, hormonů, enzymů a vitamínů [13].

Liposomy lze připravit etanolovým vstřikováním, odpařením reverzní fáze, pomocí ultrazvuku, pomocí zmrazení, vysušení nebo vysokotlaké homogenizace [14].

2.1.9 Kokrystalizace

Kokrystalizace se řadí mezi nové metody. Jako vnější fáze se využívá sacharóza, která obklopuje aktivní látku. Sacharózový sirup se udržuje za přesyceného stavu při vyšších teplotách, aby nedošlo ke krystalizaci. K sacharózovému sirupu se přidá určené množství aktivní látky a poté začne roztok krystalizovat. Míchání pokračuje do té doby, dokud z nádoby nezačínají vypadávat aglomeráty. Tyto zapouzdřené produkty se poté suší na požadovanou vlhkost [9].

2.2 Vnější fáze používané pro enkapsulaci

Mnoho látek může být použito pro vytvoření vnějších fází. Nicméně, předpisy pro aditiva v potravinářství jsou mnohem přísnější, než např. ve farmaceutickém průmyslu. Různé sloučeniny, které jsou běžně využívány pro enkapsulaci léčiv, nemohou být využity v potravinářském průmyslu, protože mnoho z těchto látek nebylo certifikováno pro použití v potravinářství a nebyly zařazeny k aditivům, které patří do skupiny “všeobecně považovaných za bezpečné” (GRAS) [1].

Materiály pro vytvoření vnější fáze by měly být biologicky odbouratelné a vytvořit bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím. Většina použitých materiálů v potravinářském průmyslu jsou biomolekuly. Tyto biomolekuly musí být schopné udržet aktivní látku v kapsli během zpracování a skladování za různých podmínek, nereagovat s aktivní látkou, a musí s nimi být jednoduchá manipulace [1].

Ze všech možných materiálů se nejčastěji používají polysacharidy - škrob a jeho deriváty, celulóza a její deriváty. Dále se používá arabská guma, tragant guma, pektiny a sójové polysacharidy, též mořské extrakty jako jsou karagenany nebo alginát. Využívají se také mikrobiální a živočišné polysacharidy jako jsou dextran, chitosan, xanthan a gellan. Také se dají použít bílkoviny a tuky. K dispozici máme též mléčné a syrovátkové proteiny, kasein, želatinu, gluten. Pro přípravu vnějších fází se dají využít mastné kyseliny, mastné alkoholy, vosky (včelí vosk, karnaubský vosk), glyceridy a fosfolipidy [1].

2.2.1 Polysacharidové látky

Polysacharidy se skládají z více než 10 monosacharidových jednotek a mohou obsahovat také až kolem milionu stavebních jednotek vzájemně spojených glykosidickými vazbami. Polysacharidy jsou tvořeny buď identickými monomery, častěji se však skládají z dvou nebo více různých monosacharidů nebo obsahují deriváty monosacharidů, jejich estery [15].

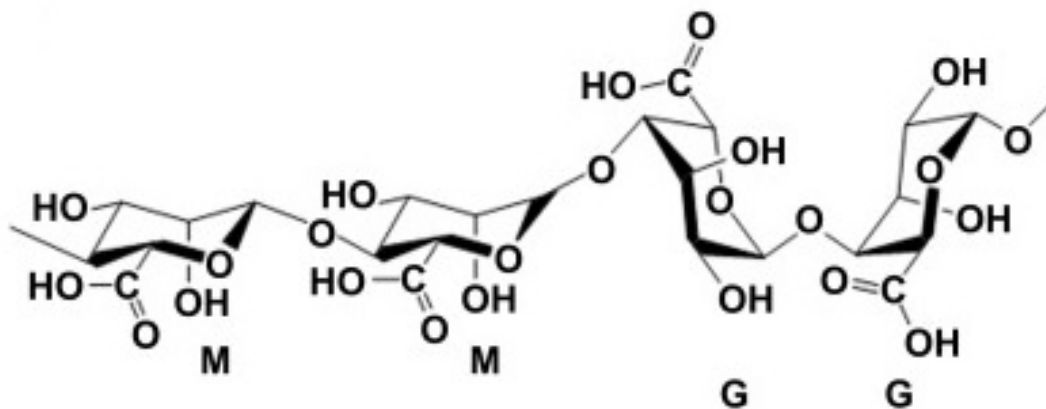
2.2.1.1 Alginát

Algináty jsou nerozvětvené polysacharidy skládající se z mannuronové a guluronové kyseliny. Přírodní kopolymer je důležitou součástí řas, dále se vyskytuje jako exopolysacharid u bakterií, především u bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Alginát je produkován obecně zejména bakteriemi z rodu *Azotobacter* (*A. vinelandii*, *A. crococcum*) a *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. mendocina*, *P. fluorescens*, *P. syringae*) [15], [16].

I když je možné získat alginát z obou možných zdrojů, komerčně je dostupný pouze alginát z mořských řas. Alginát se získává jako sodná sůl extrakcí řas alkáliemi (NaOH , Na_2CO_3). Z extraktů se sráží jako vápenatá sůl přidávkem CaCl_2 nebo okyselením HCl jako alginová kyselina. Vápenatá sůl se převádí na alginovou kyselinu a z té se získává finální komerční produkt (sodná sůl) neutralizací pomocí Na_2CO_3 [15], [16].

Alginátové složení, sekvence a molekulová hmotnost se liší podle zdroje a druhů, které produkují kopolymer. Vzhledem k velkému množství řas dochází k velké produkci alginátu. Průmyslová produkce alginátu je cca 30 000 tun ročně [16].

V současné době je tenence navrhovat i biomateriály na bázi alginátů. Algináty se používají jako obvazy pro krytí rán k léčbě akutních i chronických ran. Dále se alginát využívá díky svým schopnostem zesílení a vytvoření hydrogelů pro enkapsulaci, především v biomedicině [16], [17].



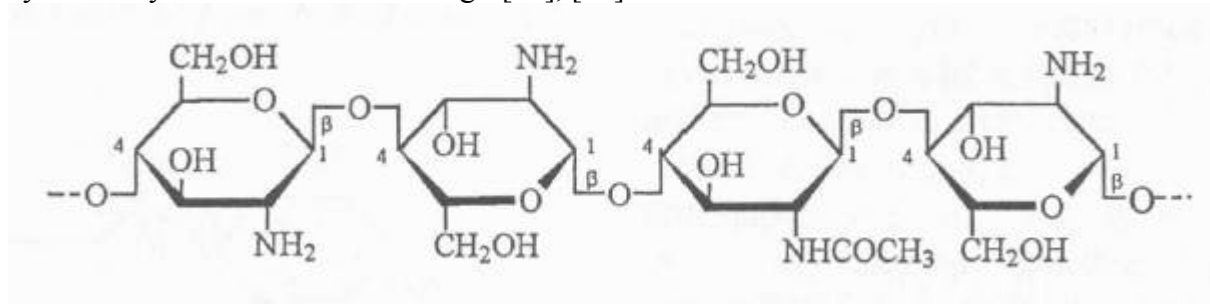
Obr. 4 Struktura alginátu [17]

2.2.1.2 Chitosan

Chitosan je přírodní lineární biopolyaminosacharid, který se získává alkalickou deacetylací chitinu, což je druhý nejhojnější polysacharid po celulóze. Chitosan obsahuje 5-25 % N-acetylglukosaminových jednotek a 75-95 % glukosaminových jednotek. Komerčně je chitosan k dispozici ve formě suchých vloček, roztoku nebo jemného prášku. Velikost částic, hustota, viskozita, molekulová hmotnost a stupeň deacetylace jsou velmi důležité vlastnosti chitosanu. Vzhledem ke snadné dostupnosti volných aminoskupin v chitosanu nese

polymer kladný náboj a tím může reagovat s negativně nabitými povrchy nebo polymery. Chitosan je nerozpustný ve vodě a v organických rozpouštědlech. Rozpustný je ve zředěném vodném kyselém roztoku při pH pod 6,5 [18].

Vlastnosti chitosanu jako je biologická rozložitelnost, nízká toxicita a dobrá biokompatibilita činí chitosan vhodným pro použití v biomedicině a farmacii, pro imobilizaci enzymů a živých buněk a v oftalmologii [18], [19].



Obr. 5 Struktura chitosanu [15]

2.2.1.3 Agar

Agary jsou lineární polysacharidy, jejichž staveními jednotkami jsou β-D-galaktopyranosa a 3,6-anhydro-α-L-galaktopyranosa střídavě spojené glykosidickými vazbami. Agary tvoří intracelulární matici řady druhů červených mořských řas (*Rhodophyceae*), hlavně *Gracilariaceae* a *Gelidiaceae*. Agary zastávají v řasách stejnou funkci jako celulóza u vyšších rostlin [15], [20].

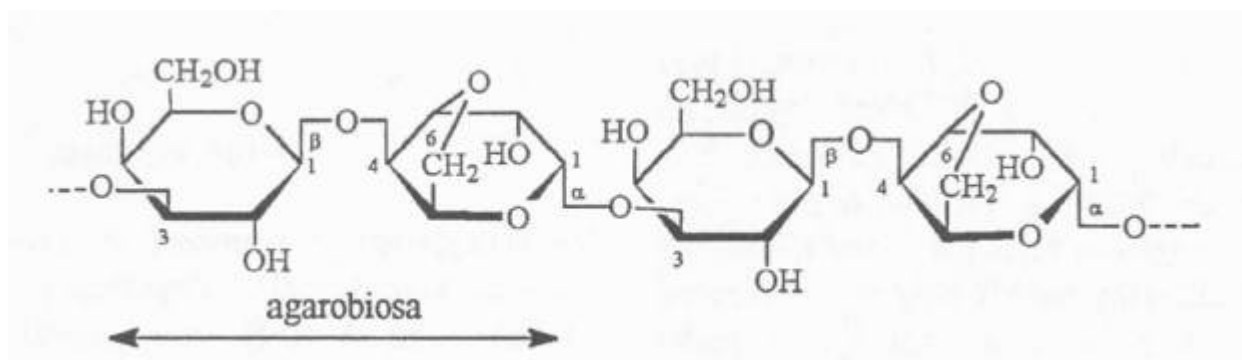
Agary se z řas získávají nejčastěji extrakcí horkou vodou (o teplotě vyšší než je bod tání agaru) v neutrálním kyselém nebo alkalickém prostředí. V alkalickém prostředí zároveň dochází k parciální hydrolyze sulfátových skupin a vznikají agary s modifikovanými vlastnostmi. Z extraktů se vymražením získávají gely, které se suší. Obecně platí, že druhy *Gracilaria* produkují agary s nízkou kvalitou díky vysokému obsahu síranů. Je však možné kvalitu zlepšit pomocí již zmiňované alkalické hydrolyzy, která převádí L-galaktosu-6-síran na 3,6-anhydro-L-galaktosu [15], [20].

Želírující vlastnosti agaru jsou široce využívány ve farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu. Systém agar-želatina byl využit k enkapsulaci bylinného extraktu rodu *Phyllanthus*, který může neutralizovat paracetamol vyvolávající hepatotoxicitu, podporovat antioxidační a protizánětlivé účinky [21], [22].

2.2.1.4 Agarosa

Agarosa je neutrální polysacharid. Základní stavební jednotkou agarosy je agarobiosa. Za působení tepla dochází k tvorbě gelu ve vodném roztoku, který je hydrofilní, makroporézní a neobsahuje nabitě molekuly [23].

Agarosové mikrokuličky mají uplatnění v řadě praktických aplikací. Mohou být vhodné při chromatografické separaci, v lékařství a farmacii, využívají se při enkapsulaci buněk a v potravinářském průmyslu. Tyto agarosové mikrokuličky nacházejí uplatnění v enkapsulaci látek pro široké spektrum potravinových doplňků jako jsou probiotika a antioxidanty [23], [24].



Obr. 6 Struktura agarobiosy [15]

2.2.1.5 Škrob

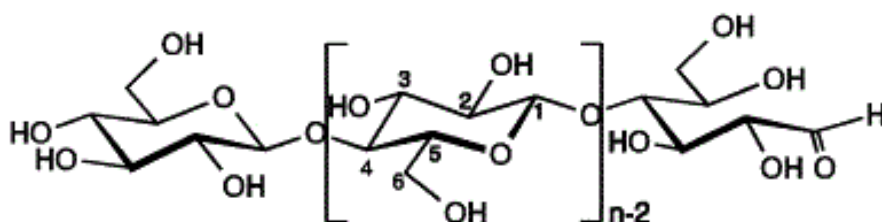
Většina nativních škrobů se skládá z amylosy a amylopektinu, dvou homopolysacharidů složených z molekul α -D-glukopyranosy. V dnešní době je využití nativních škrobů omezeno jejich nevhodnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi. Nativní škroby se proto různým způsobem modifikují, aby se nevhodné vlastnosti omezily nebo aby se vytvořily škroby s jinými vlastnostmi [15].

Škrob je jednou z nejdůležitějších složek v potravinářském, textilním, lékařském a chemickém průmyslu. Škrob je stále více využíván i jako nosič pro nutriční látky a léčiva z důvodu jeho nízké ceny, široké dostupnosti a neškodnosti [25].

2.2.1.6 Celulosa

Celulosa je nejrozšířenější organickou sloučeninou na Zemi. Vyskytuje se jako základní strukturní polysacharid buněčných stěn vyšších rostlin. Homoglukan celulosa je vysokomolekulární lineární polymer D-glukosových jednotek vázaných β -1,4 glykosidickou vazbou (obr. 7). Celulosa je nerozpustná ve vodě, zředěných kyselinách, zásadách a většinou rozpouštědel. Celulosa se rozpouští v koncentrovaných kyselinách, čímž dochází k rozkladu na rozpustné fragmenty celobiosu, případně i na D-glukosu [15], [26].

Nativní celulosa se přidává do potravin jako nekalorické zahušťovadlo nebo k vyvolání zákalů. Větší uplatnění v potravinářském průmyslu ovšem mají modifikované celulosy [15].

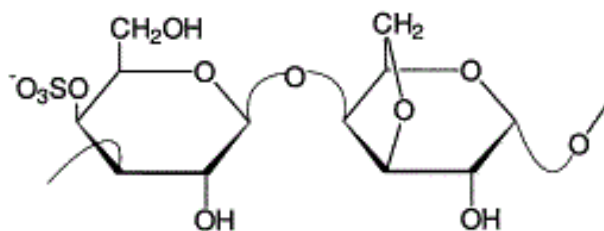


Obr. 7 Celulosa [27]

2.2.1.7 κ -karagenan

κ -karagenan je přirozeně se vyskytující polysacharid izolovaný z mořské červené řasy. Je snadno dostupný, netoxický a má vysokou molekulovou hmotnost. Polymer je složený z opakujících se jednotek β -D-galaktosa-sulfátu a 3,6 anhydro- α -D-galaktosy. κ -karagenan lze snadno převést na gel v přítomnosti kovových iontů, aminů, aminokyselinových derivátů a ve vodě rozpustných organických rozpouštědel [28].

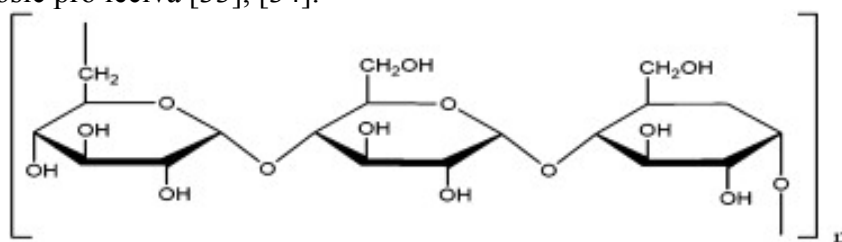
κ -karagenan byl použit k enkapsulaci enzymů lipasy, glukosa oxidasy spolu s chitosanem, α -chymotrypsinu nebo k enkapsulaci mikroorganismu *Pseudomonas aeruginosa* [28], [29], [30], [31].



Obr. 8 κ -karagenan [32]

2.2.1.8 Pullulan

Jedná se o extracelulární polysacharid produkovaný *Aureobasidium pullulans* a je v současné době stále více využíván díky svým vlastnostem. Pullulan není toxický, imunogenní, karcinogenní a mutagenní. Suchý pullulan je bílý prášek bez zápachu. Polysacharid pullulan je dobře rozpustný ve vodě a ve zředěných zásadách, nerozpustný v alkoholech a organických rozpouštědlech. V posledních letech je zkoumán pro biomedicínské účely jako je přenos genů, cílené protidrogové terapie, při hojení ran a jako nosič pro léčiva [33], [34].



Obr. 9 Pullulan [33]

2.2.2 Ostatní látky použitelné k enkapsulaci

2.2.2.1 Želatina

Želatina je rozpustný protein získaný částečnou hydrolýzou kolagenu, který je hlavní složkou chrupavek, kostí, kůže a kůže. Zdroj, stáří zvířete, a typ kolagenu jsou vlastnosti, které ovlivňují vlastnosti želatiny. Jsou známy dva druhy želatiny v závislosti na její přípravě: želatina typu A (isoelektrický bod při pH 8-9), želatina typu B (isoelektrický bod při pH 4-5), které byly získány za kyselých či zásaditých podmínek [35].

Potravinářské, fotografické, kosmetické a farmaceutické aplikace jsou založeny především na želírujících a viskoelastických vlastnostech želatiny. V současnosti se zejména v potravinářském průmyslu zvyšuje využití želatiny jako emulgátorů, stabilizátorů, součást biologicky rozložitelných obalů nebo jako vnější fáze při enkapsulaci [35].

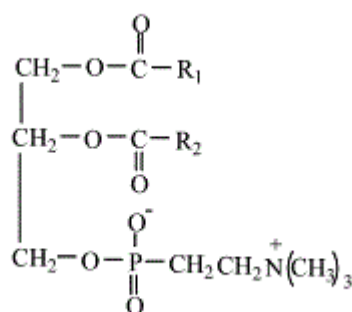
Koacervace pomocí želatiny s aniontovými polymery je zvláště zajímavá, protože mohou zachytit funkční látku v nosiči a tím ji chránit před oxidací nebo při skladování. Želatinové kapsule vytvořené pomocí sprejového sušení byly vyvinuty z důvodu zlepšení přežití bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií proti škodlivým podmínkám při zpracování a proti agresivním podmínkám v žaludku [35].

2.2.2.2 Syrovátkové proteiny

Hlavním syrovátkovým proteinem je β -laktoglobulin. Příprava částic ze syrovátkových proteinů se často provádí s kombinovaným použitím polysacharidů jako je chitosan nebo alginát. V poslední době se potahuje alginát nebo pektin syrovátkovými proteiny pro zapouzdření mikroorganismů [36].

2.2.2.3 Lecithin

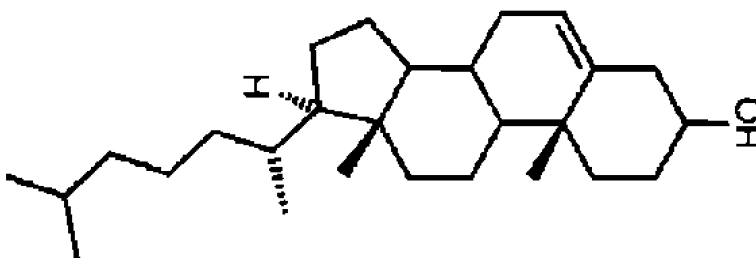
Lecithin je látka, která je velmi důležitá při přípravě liposomů. Z chemického hlediska se jedná o fosfatidylcholin. Průmyslový lecithin vzniká při rafinaci rostlinných olejů. Lecithin obsahuje mnoho olejů (30 až 50 %) a různé doprovodné látky (cukry, aminokyseliny, kovové ionty), dále chlorofylová a karotenoidní barviva. Největší část lecithinu se zkrmuje a jen malá část se využívá v potravinářském průmyslu [37].



Obr. 10 Lecithin [38]

2.2.2.4 Cholesterol

Cholesterol je významnou složkou živočišných plazmatických membrán a v menší míře se vyskytuje také v membráně vnitrobuněčných organel. Cholesterol je metabolický prekurzor steroidních hormonů. Cholesterol se vyskytuje především v nervových orgánech, ve vaječných žlutcích, svalovině, mléce, sýru, sádle a v menší míře i másle. Díky své amfifilní povaze je schopen se začlenit do fosfolipidové dvojvrstvy a stabilizovat liposomy [15], [23], [39].



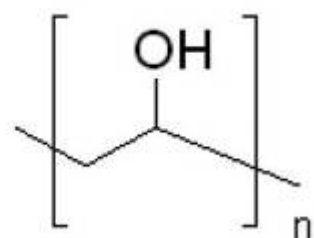
Obr. 11 Cholesterol [40]

2.2.2.5 Polyvinylalkohol (PVA)

Polyvinylalkohol je bílý prášek krystalického charakteru. PVA je levný, dostupný a netoxický pro mikroorganismy. Jeho odolnost vůči rozpouštědlům závisí na obsahu nehydrolyzovaného polyvinylacetátu, na střední molekulové hmotnosti a také na teplotě. V olejích není rozpustný ani při vyšších teplotách. V jednosytných alkoholech bobtná,

ve vícesytných (např. v glycerolu) se rozpouští, zvláště za tepla. Je málo termoplastický. Lze jej použít za teplot od -50°C do 130°C, nad 200°C se rozkládá [41], [42].

Polyvinylalkohol připomíná svým chováním želatinu. V potravinářství se využívá pro přípravu ovocného želé, v chemickém průmyslu jako ochranný koloid, jako zahušťovadlo pro nátěrové hmoty, k výrobě lepidel v kombinaci se škrobem. Vyrábějí se z něj různé obalové fólie, chirurgické nitě, textilní vlákna a různá těsnění. Díky tomu, že PVA není toxický pro mikroorganismy, se využívá jako materiál pro jejich imobilizaci. PVA je dále používán jako nosič pro různé enzymy. Chemická struktura způsobuje stabilizaci proteinů [41], [42], [43].



Obr. 12 Polyvinylalkohol [44]

2.3 Enkapsulace velkých polymerních molekul a mikroorganismů

Jak již bylo zmíněno, enkapsulace je vhodná pro řadu materiálů, které jsou citlivé na vnější podmínky a potřebují chránit před řadou dalších faktorů. Enkapsulace slouží pro transport mnoha aktivních látek, jako jsou enzymy, mastné kyseliny, vitamíny, minerální látky a samozřejmě i živé buňky, a to především probiotické kultury. Dále se může zapouzdření využít k imobilizaci buněk nebo enzymů při některých procesech zpracování potravin, jako jsou fermentační procesy nebo při produkci mikrobiálních metabolitů [9].

V posledních letech stoupá zájem o výrobu potravin obsahujících zapouzdřené probiotické bakterie. Probiotické bakterie nejsou schopny přežívat podmínky skladování, zpracování výrobku a též nepříznivé podmínky v potravinách. V některých studiích bylo prokázáno, že počet živých bakterií v některých produktech byl nižší než je požadovaná či deklarovaná úroveň. Životaschopnost a aktivita bakterií jsou velmi důležitá kritéria, protože bakterie musí přežít v potravině během doby použitelnosti, během průchodu přes kyselé prostředí v žaludku a musí odolávat hydrolytickým enzymům a žlučovým solím v tenkém střevě. Tato životaschopnost a aktivita bakterií je důležitá u potravin s jakýmkoliv zdravotním tvrzením, které musí splňovat kritérium počtu probiotických bakterií v produktu. Kvůli jejich zdravotním účinkům byly probiotické bakterie začleněny do širokého sortimentu potravin, včetně mléčárenských výrobků (jogurt, sýr, zmrzlina) nebo do obilovin, čokolády a šťáv. Využívání probiotických živých buněk s fyzickou bariérou odolává nepříznivým podmínkám prostředí. Kromě toho, že enkapsulační metody jsou využívány ke zvýšení přežití a transportu bakteriálních kultur, byly enkapsulační techniky využity také pro zapouzdření bakterií při procesech fermentace [45], [46], **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**, [47].

2.3.1 Imobilizace enzymů

Kromě nesporných výhod enzymů existuje mnoho problémů při jejich produkci a využívání. Vysoké náklady na izolaci a purifikaci enzymů, nestabilita jejich struktury po izolaci z jejich přirozených prostředí a jejich citlivost k jiným podmínkám než optimálním a inhibiční účinek stopových doprovodných látek jsou hlavními problémy k řešení. Byly navrženy systémy k opakovanému použití enzymů. Imobilizací enzymů je dosaženo fixací těchto enzymů na povrch nebo uvnitř nosičů. Imobilizované enzymy jsou odolnější než enzymy volné. Největší výhodou je jednoduché oddělení enzymů a produktu, vícenásobné použití a kontinuální proces [48].

Enzymy můžeme imobilizovat adsorpcí, pomocí iontové vazby, kovalentní vazbou na nerozpustný nosič nebo enkapsulací.

Enzyme (EC number)	Substrate	Product
Glucose isomerase (5.3.1.5)	Glucose	Fructose (high-fructose corn syrup)
β-Galactosidase (3.2.1.23)	Lactose	Glucose and galactose (lactose-free milk and whey)
Lipase (3.1.1.3)	Triglycerides	Cocoa butter substitutes
Nitrile hydratase (4.2.1.84)	Acrylonitrile	Acrylamide
	3-Cyanopyridine	Nicotinamide
	Adiponitrile	5-Cyanovaleramide
Aminocyclase (3.5.1.14)	D,L-Amino acids	L-Amino acids (methionine, alanine, phenylalanine, tryptophan, valine)
Raffinase (3.2.1.22)	Raffinose	Galactose and sucrose (raffinose-free solutions)
Invertase (3.2.1.26)	Sucrose	Glucose/fructose mixture (invert sugar)
Aspartate ammonia-lyase (4.3.1.1)	Ammonia + fumaric acid	L-Aspartic acid (used for production of synthetic sweetener aspartame)
Thermolysin (3.4.24.27)	Peptides	Aspartame
Glucoamylase (3.2.1.3)	Starch	D-Glucose
Papain (3.4.22.2)	Proteins	Removal of "chill haze" in beers
Hydantoinase (3.5.2.2)	D,L-Amino acid hydantoins	D,L-Amino acids
Penicillin amidase (3.5.1.11)	Penicillins G and V	6-Aminopenicillanic acid (precursor of semi-synthetic penicillins, e.g. ampicillin)
β-Tyrosinase (4.1.99.2)	Pyrocatechol	L-DOPA

Obr. 13 Využití některých imobilizovaných enzymů [48]

2.3.1.1 Adsorpce

Při adsorpci jsou enzymy zachyceny na povrch nosiče pomocí fyzikálních sil (Van der Waalsovy síly), ale uplatňují se i další interakce jako iontové nebo vodíkové vazby a hydrofobní interakce. Jako nosiče se nejčastěji používají sklo, křemičitany, silikagel, bentonit a další. Výhodou této metody je jednoduchost, nevýhodou malá pevnost, která je závislá na pH, teplotě, iontové síle, koncentraci substrátu a použitém rozpouštědle [49].

2.3.1.2 Iontová vazba

Iontová vazba je založena na elektrostatické přitažlivosti opačně nabitých skupin nosiče a enzymu. Pro vazbu záporně nabitých skupin enzymu se jako nosič využívá anex, pro vazbu kladně nabitých skupin enzymu katex. Velkou výhodou této imobilizační metody je snadnost navázání enzymu a velice snadná regenerace [49].

2.3.1.3 Kovalentní vazba na nerozpustný nosič

Jako nosiče mohou být použity organické látky, přirozené nebo syntetické polymery, musí však být nerozpustné a mít hydrofobní či hydrofilní povrch. K vazbě dochází přes aminoskupiny, karboxylové, sulfhydrylové, hydroxylové, imidazolové a fenolové skupiny

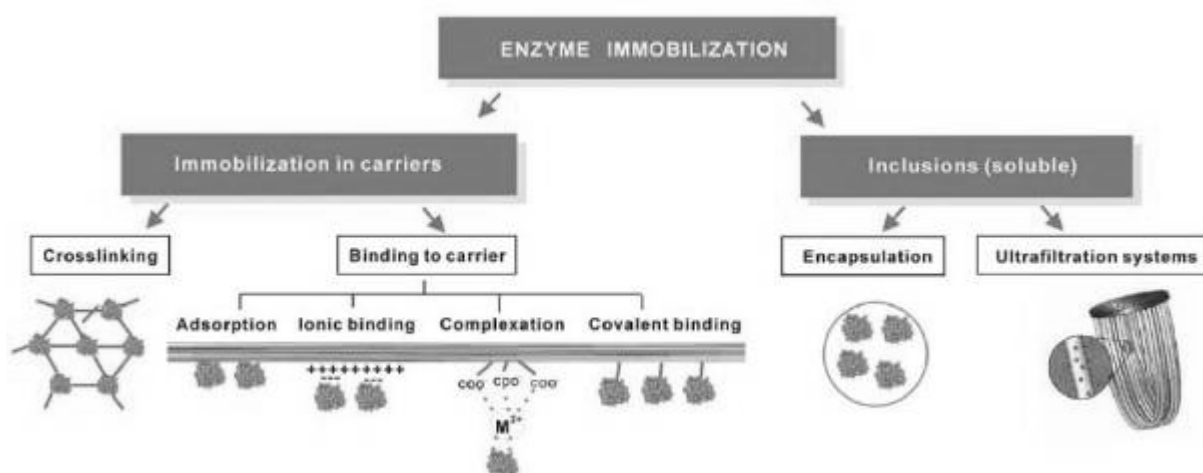
bílkovin [49]. Je vždy nutné uskutečnit vazbu přes ty skupiny, které nejsou důležité pro samotnou enzymovou reakci [49].

2.3.1.4 Polymerace enzymů do gelu matrice

Tato metoda je prováděna tak, že polymerace gelu probíhá v přítomnosti enzymu. Pro tento účel imobilizace se používá nejčastěji agar, želatina, alginát, karagenan a další [49].

2.3.1.5 Mikroenkapsulace

Při této metodě se enzym obalí sempermeabilní membránou. Enkapsulace se technicky provádí buď mezipovrchovou polykondensací, nebo mezipovrchovou koacervací. Při mezipovrchové polykondenzaci je enzym a hydrofilní monomer emulgován na požadovanou velikost v organickém rozpouštědle nerozpustném ve vodě, poté se přidá hydrofobní monomer rozpustný v organickém rozpouštědle. Hydrofilní a hydrofobní monomer spolu reagují za vzniku polymeru. Při mezifázové koacervaci je ve vodě rozpustný enzym emulgován v organickém roztoku polymeru. Poté je přidáno rozpouštědlo nemísitelné s vodou, ale mísitelné s prvním použitým rozpouštědlem, které sráží rozpuštěný polymer [49].



Obr. 14 Znárodnění možnosti imobilizace enzymů [50]

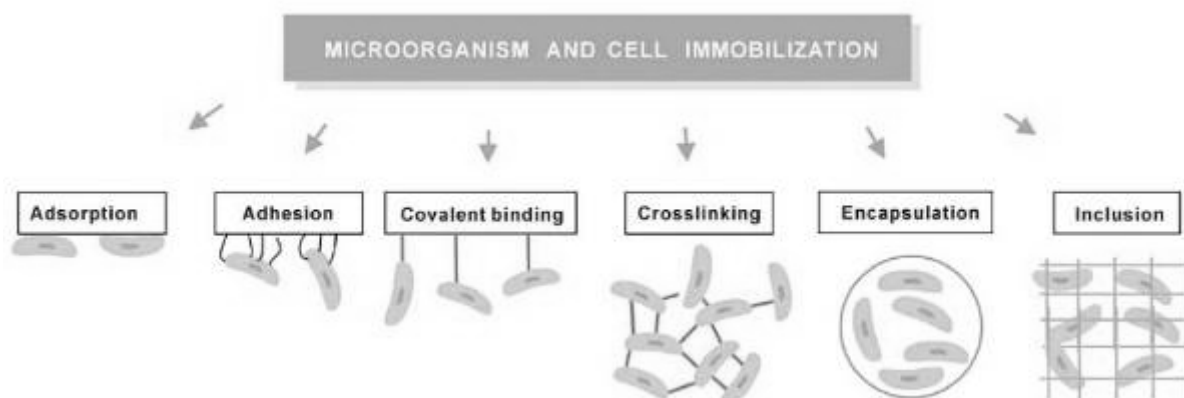
2.3.1.6 Proteolytické enzymy

Proteolytické enzymy katalyzují hydrolýzu bílkovin, peptidů, amidů a esterů aminokyselin. Tyto enzymy se liší původem, lokalizací, fyzikálně chemickými vlastnostmi, specifitou, mechanismem působení, fyziologickými funkcemi i možnostmi jejich praktického využití. Proteolytické enzymy jsou přítomny prakticky ve všech živých buňkách a navíc jsou vylučované i do vnějšího prostředí, resp. do trávicího systému vyšších organismů. Všeobecně jsou známy jejich různé regulační funkce v organismu (limitovaná proteolýza, účast při srážení krve, aktivace při různých obranných mechanismech). Kromě toho jsou známy i jejich rozsáhlé aplikace ve formě enzymových preparátů v průmyslové praxi (biodetergenty, produkce sýrů, zpracování kůže, produkce hydrolyzátů bílkovin, stabilizace piva), medicíně a farmacii (preparáty zlepšující trávení, čištění kontaktních čoček), kosmetice (keratolytické změkčující přípravky, pleťové peelingové masky), v běžné laboratorní praxi a vědeckovýzkumné činnosti **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**

Z živočišných proteáz mají největší význam trypsin, chymotrypsin, pepsin a chymosin. Z rostlinných proteáz se hojně využívají papain, bromelain a ficin. Mikrobiální proteázy jsou obzvláště významné. Jejich velikou předností je snadnost výroby ve velkých množstvích a možnost volby vhodných vlastností enzymu změnou produkčního kmene. Mikrobiální proteázy můžeme rozdělit do dvou velkých skupin, a to na proteázy bakteriální a plísňové. Bakteriální proteázy dominují co do objemu výroby i počtu praktických aplikací. Z hlediska mechanismu působení patří nejpoužívanější alkalické proteázy (optimum pH 6-12) mezi serinové proteázy. Neutrální proteázy s optimem působení při pH 7-8 jsou většinou metaloenzymy, mající v aktivním místě zinek. Jsou bakteriálního (rod *Bacillus*) i plísňového (rod *Aspergillus*) původu. Kyselé proteázy jsou vesměs plísňového původu a připomínají svými vlastnostmi živočišný pepsin [52].

2.3.2 Imobilizace mikroorganismů

Imobilizací buněk dosáhneme jejich fixaci na povrch nebo dovnitř nosiče. Velkou výhodou imobilizovaných buněk je využití ve výrobcích, které vyžadují multienzymové systémy nebo při biokonverzích, kde je důležitá jejich vyšší životaschopnost v různém prostředí. Mezi nejčastější techniky patří adsorpce, adheze, kovalentní vazba, zesíťování a enkapsulace.



Obr. 15 Znávorění možností imobilizace mikroorganismů [50]

2.3.3 Probiotika

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které se dostávají do těla v potravě a příznivě ovlivňují zdraví člověka. Historicky byly a pořád ještě jsou nejpoužívanějšími probiotickými mikroorganismy bakterie mléčného kvašení, hlavně rody *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* a *Enterococcus*. Výčet probiotických mikroorganismů je však daleko bohatší a obsahuje další bakteriální rody a druhy (*Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium butyricum*, *Propionibacterium*), ale také kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) a plísně (*Aspergillus oryzae*). Probiotické mikroorganismy mají využití jak ve výživě lidí, tak i zvířat. Tyto kultury jsou dnes stále přidávány do mléčných kysaných výrobků (hlavně *Bifidobakterie* a *Lactobacillus*). V těchto produktech je vždy třeba řešit problematiku zachování počtu živých buněk až do konce expirační doby. Další možností je podávání probiotik ve formě kapslí, lyofilizovaných, popř. sušených prášků. [53].

Hojně probírané jsou mechanismy účinku probiotik. U lidí se samozřejmě očekávají především kladné účinky na zdravotní stav. Mezi nejčastější potenciální účinky patří terapie průjemových onemocnění, redukce hladiny sérového cholesterolu, prevence kolorektální rakoviny a rakoviny močového měchýře [53].

2.3.3.1 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* obsahuje fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní nepohyblivé bakterie mléčného kvašení. Fermentují glukózu a laktózu a hlavním produktem fermentace je kyselina mléčná, dále vzniká kyselina octová, etanol a CO_2 . Nacházejí se ve fermentovaných rostlinných i živočišných materiálech a výrobcích. Hojně se objevují v trávicím traktu zvířat a lidí. Teplotní rozsah pro růst tohoto rodu je široký, pohybuje se mezi 15°C – 45°C , závisí na druhu bakterií. Optimální pH pro růst je 4,5 až 6,4. Rod je vcelku náročný na živiny v médiu, kromě zmíněné laktózy a glukózy také potřebuje aminokyseliny, nukleotidy a některé vitamíny. V potravinářství se používají z toho důvodu, že kyselina mléčná snižuje pH v daném prostředí a tím brání množení hnilobných a patogenních bakterií. V mlékárenství se používají nejvíce rody *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei*. Bakterie rodu *Lactobacillus* se kromě střevního traktu objevují i ve volné přírodě a v důsledku toho jsou i častou součástí potravy [53].

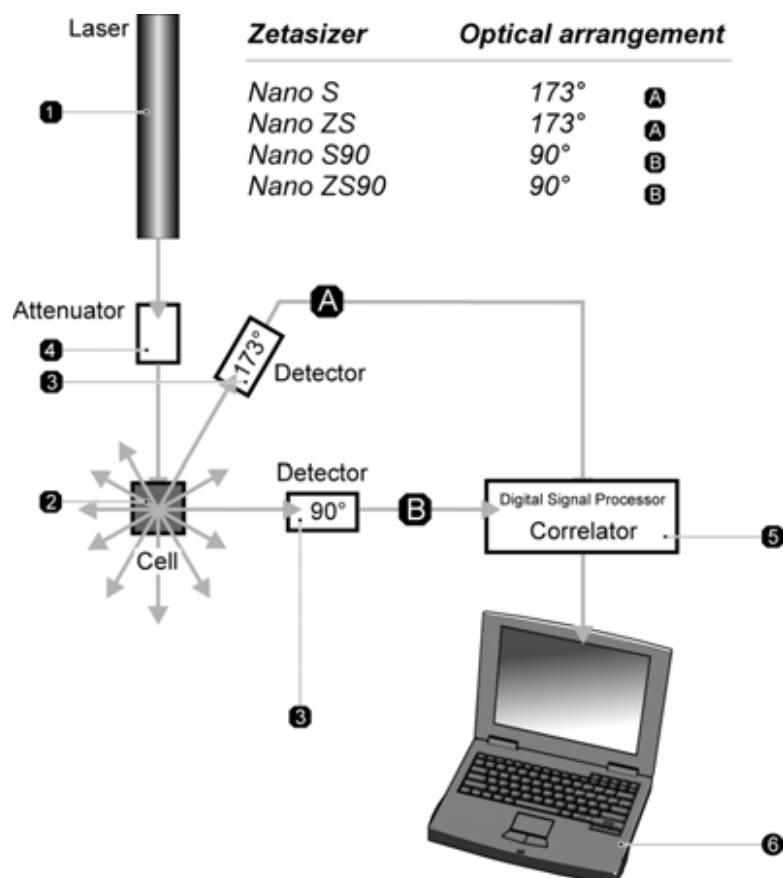
2.3.3.2 Rod *Bifidobacterium*

Rod *Bifidobacterium* tvoří grampozitivní, anaerobní a nesporulující skupina bakterií. Nejčastěji jsou nepravidelného tvaru a objevují se jak jednotlivě, tak i v řetízích nebo hvězdovitém uspořádání. Ačkoliv se dá rod považovat za striktně anaerobní, vyskytují se druhy, které jsou za přítomnosti určitého množství CO_2 nebo bifidogenních faktorů schopny snášet přítomnost O_2 v prostředí. Teplotní optimum pro tento rod je v rozmezí 37°C až 41°C , ale minimum je okolo 28°C , maximum pak okolo 43°C . Optimální hodnoty pH pro tento rod jsou v rozmezí mezi 6,5 a 7. Rod *Bifidobacterium* štěpí fermentovatelné sacharidy na kyselinu mléčnou a octovou. Bakterie rodu *Bifidobacterium* kolonizují GIT a ztělesňují v něm dominantní bakteriální populaci. V současnosti je v rámci rodu *Bifidobacterium* určeno 38 bakteriálních druhů, z nichž je šest využíváno pro své probiotické vlastnosti. Jako probiotické kultury se používají nejvíce rody *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium thermophilum* [53].

2.4 Metody využívané k analýze částic

2.4.1 Stanovení distribuce velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla

Velikost částic se dá zjistit pomocí dynamického rozptylu světla, který měří Brownův pohyb a uvádí jej do vztahu s velikostí částic. To se provádí osvětlením částic laserem a analyzováním fluktuací intenzity v rozptýleném světle. Částice suspendované v kapalině nejsou nikdy nehybné, neustále se pohybují vlivem Brownova pohybu. Brownův pohyb je pohyb částic díky náhodné srážce s molekulami kapaliny. Vztah mezi velikostí částice a její rychlostí v důsledku Brownova pohybu je definovaný ve Stokes-Einsteinově rovnici. Důležitým faktem u dynamického rozptylu je to, že malé částice se pohybují rychleji než částice velké. Jelikož jsou částice stále v pohybu, tak i intenzita rozptýleného světla stále fluktuuje. Přístroj Zetasizer používaný k analýze částic měří rychlost intenzity fluktuace a pak ji používá pro vypočítání velikosti částic [54].



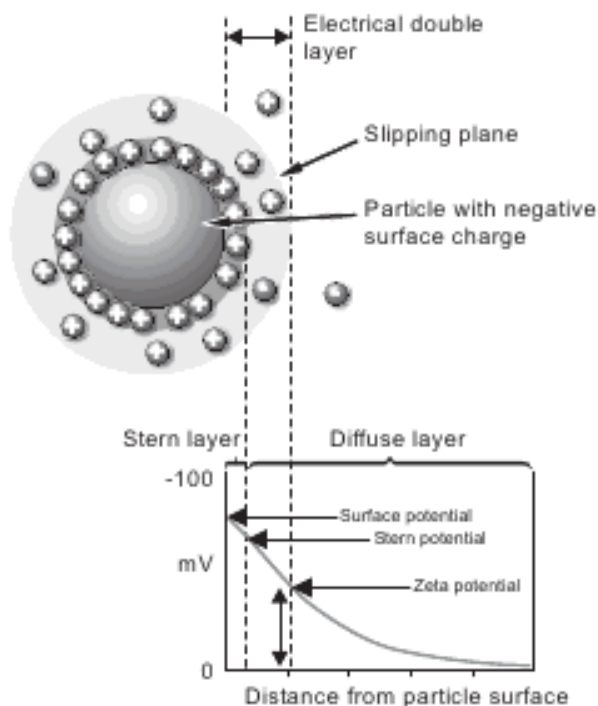
Obr. 16 Schéma přístroje Zetasizer [54]

2.4.2 Stanovení stability koloidního systému pomocí zeta potenciálu

Velikost zeta potenciálu naznačuje potenciální stabilitu koloidního systému. Koloidní systém vzniká tehdy, když jedno ze tří skupenství (kapalné, plynné, pevné) je dispergováno v jiném skupenství [54].

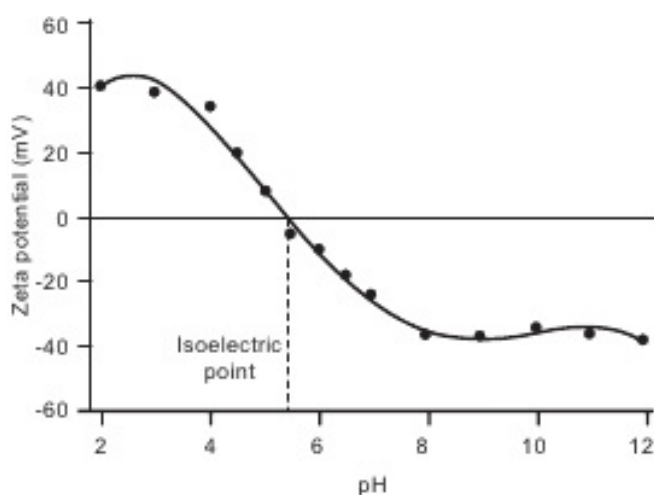
Přístroje řady Zetasizer vypočítávají zeta potenciál stanovením elektroforetické pohyblivosti a poté použitím Henryovy rovnice. Vznik síťového náboje na povrchu částic ovlivňuje distribuci iontů v okolní mezifázové oblasti, což má za následek zvýšenou koncentraci opačných iontů (iontů s opačným nábojem, než má částice) těsně u povrchu. Tudíž kolem každé částice existuje elektrická dvojvrstva. Vrstva kapaliny obklopující částici existuje jako dvě části; vnitřní oblast, nazývaná Sternova vrstva, kde jsou ionty silně vázané, a vnější, difúzní oblast, kde jsou ionty méně pevně připojené. Uvnitř difúzní vrstvy existuje teoretická hranice, uvnitř které ionty a částice tvoří stabilní jednotku. Když se částice pohybuje (např. kvůli gravitaci), ionty uvnitř hranice se pohybují s ní, ale všechny ionty za hranicí s částicí neputují. Tato hranice se nazývá povrch hydrodynamického smyku nebo rovina skluzu. Potenciál, který existuje na této hranici, je známý jako potenciál zeta [54].

Jestliže všechny částice v suspenzi mají velký záporný nebo kladný potenciál zeta, pak budou inklinovat k odpuzování se navzájem, a neexistuje žádná tendence k tomu, aby flokulovaly (vločkovaly). Jestliže však částice mají nízké hodnoty potenciálu zeta, pak neexistuje žádná síla, která by zabránila částicím se shlukovat a flokulovat. Obecná dělicí čára mezi stabilní a nestabilní suspenzí je zpravidla buď nad +30 mV nebo pod -30 mV [54].



Obr. 17 Schéma elektrické dvojvrstvy [55]

Nejdůležitější faktor, který ovlivňuje potenciál zeta, je pH. Pokud máme částice v suspenzi se záporným potenciálem zeta a k této suspenzi se přidá více alkálie, pak částice budou inklinovat k tomu, aby získaly zápornější náboj. Jestliže se pak k této suspenzi přidává kyselina, dosáhne se bod, kde se záporný náboj neutralizuje. Jakékoliv další přidávání kyseliny může způsobit vytváření kladného náboje. Proto křivka potenciálu zeta proti pH bude kladná při nízkém pH, a nižší nebo záporná při vysokém pH. Bod, kde vynesení prochází nulovým potenciálem zeta, se nazývá izoelektrický bod a z praktických důvodů je velmi důležitý. Normálně je to bod, kde je koloidní systém nejméně stabilní [55].

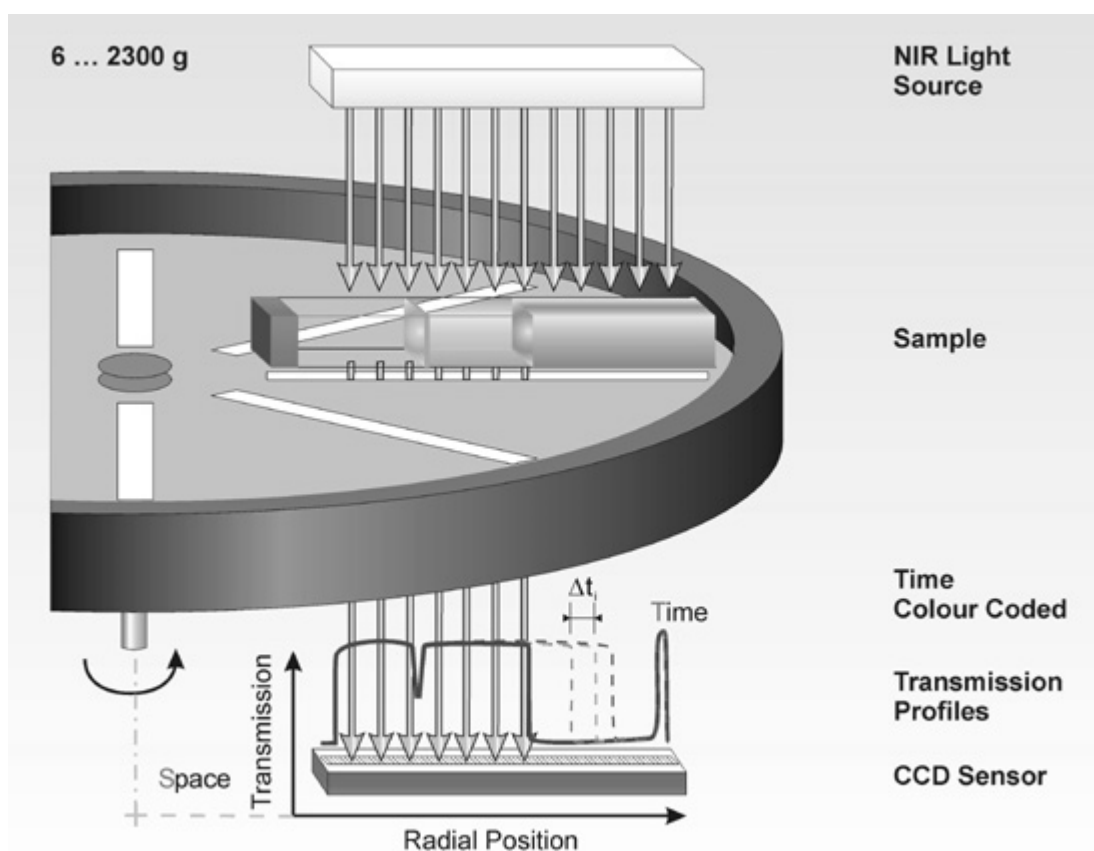


Obr. 18 Znázornění závislosti zeta potenciálu na pH [55]

2.4.3 Analytická centrifugace

Jednou z hlavních příčin koloidní nestability emulzí je separace fází podle měrných hmotností, obecně označovaná jako usazování neboli sedimentace. Jedná se o proces, při kterém dochází vlivem působení hmotnostní (objemové) síly vyvolané gravitačním zrychlením k oddělení dispergovaných částic od disperzního prostředí. Směr usazování závisí na rozdílu hustot: částice s vyšší hustotou než disperzní prostředí se pohybují ve směru gravitačního zrychlení, částice s nižší hustotou proti němu. Rychlost pohybu částic při pomalém usazování (Reynoldsovo kritérium usazování $Re_u < 0,2$), které je obvyklé pro malé částice, vyjadřuje Stokesův vztah. Jelikož je usazování v gravitačním poli obvykle relativně pomalé, je vhodné pro účely hodnocení sedimentační stability proces separace fází urychlit nahrazením gravitačního zrychlení zrychlením odstředivým. Ze závislosti rychlosti usazování na odstředivém zrychlení (otáček odstředivky) lze pak extrapolací odhadnout rychlost separace fází při skladování v normálním gravitačním poli. Za předpokladu lineární závislosti pak k tomuto odhadu dostačuje pouze jeden údaj o rychlosti sedimentace při působení zvoleného odstředivého zrychlení [56].

LUMisizer je temperovaná odstředivka, která umožňuje fotometrické sledování změn koncentrace dispergovaných látek ve vzorku vlivem působení odstředivé síly. Vzorky jsou umístěny v kyvetách, a je sledován profil transmitance NIR záření. Sedimentace dispergovaných částic se projeví jednak vyčeřením části vzorku, tzn. zvýšením transmitance, a jednak tvorbou sedimentu, tzn. snížením transmitance [56].

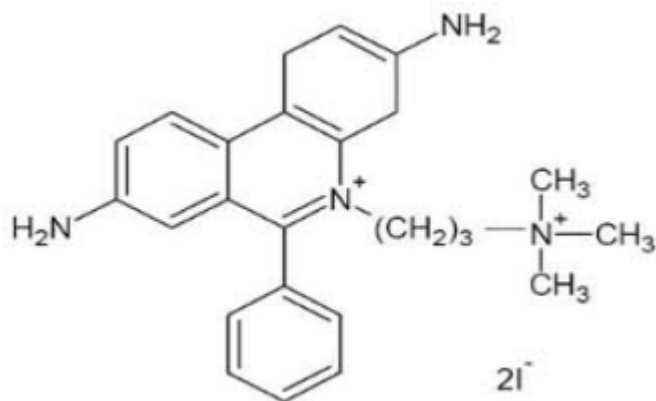


Obr. 19 Schéma analytické centrifugace [57]

2.4.4 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda, která umožňuje měření a analýzu fyzikálně-chemických vlastností buňky nebo jiných biologických částic během jejich průchodu laserovým paprskem. Ve chvíli, kdy buňka tento paprsek kříží, dochází k lomu a rozptylu světla, který podle směru a úhlu lomu bývá označován jako přímý rozptyl – tzv. forward scatter (FSC) a boční rozptyl – tzv. side scatter (SSC). FSC je charakterizován lomem světla o malém úhlu (2° - 13°) a je úměrný velikosti buňky. Úhel bočního rozptylu (SSC) je 90° a je indikátorem vnitřní buněčné struktury resp. granularity. Kromě parametrů lomu a rozptylu světla je detekována rovněž fluorescence procházejících buněk nebo částic. Fluorescenční barviva (fluorochromy) navázané na analyzované buňky nebo částice absorbují světlo určité vlnové délky vyzařované laserem a následně vyzařují (emitují) část takto absorbovaného světla o odlišné vlnové délce. V průtokové cytometrii se používají fluorochromy, které mají většinou stejné spektrum absorpční, ale jiné emisní. Vlastní analytická zařízení se nazývají průtokové cytometry a skládají se ze systému fluidního, optického a elektronického. Pomocí fluidního systému jsou buňky obaleny pláštěm nosné tekutiny a pod tlakem hnány do speciálního prostoru, kde dochází ke křížení dráhy paprsku monochromatického laseru procházejícího buňkou. Optický systém sestává z části excitační tvořené laserem a soustavou čoček a hranolů usměrňujících světelný paprsek a části sběrné. Sběrná část optiky se sestává z optických zrcadel a filtrů umožňujících detekci světelných kvant specifické vlnové délky příslušnými optickými detektory. Systém elektronický pak převádí optický signál na elektrický a zároveň jej digitalizuje pro počítačovou analýzu [58], [59], [60].

K detekci viability buněk se využívají tzv. fluorescenční sondy, které lze rozdělit do několika skupin. Nejčastějšími jsou sondy pro měření intracelulární esterázové aktivity, pro sledování membránové integrity a existence transmembránového potenciálu, v menší míře je pak u mikroorganismů využívána detekce respirační aktivity či měření intracelulárního pH. Stanovení viability pomocí membránové integrity je založeno na aplikaci látek, které za běžných podmínek neprocházejí neporušenými buněčnými membránami, popřípadě jsou ihned vylučovány do extracelulárního prostředí. Naopak, je-li cytoplazmatická membrána porušena natolik, že mohou do buněk projít, dojde k vazbě na buněčnou hmotu a k zesílení a/nebo k posunu spektra fluorescence. Tyto buňky se nepovažují za životaschopné. Využívají se především látky, které se v buňce vážou na nukleové kyseliny, jichž je v buňkách dostatečné množství. Do této skupiny se řadí především fluorescenční sonda propidiumjodid, která je využívána pro detekci viability kvasinek a bakterií [61].



Obr. 20 Strukturní vzorec propidium jodidu [61]

Další možností stanovení viability buněk je sledování intracelulární enzymové aktivity. Využívají se nefluorescenční sondy schopné procházet do buněk, které jsou poté v buňkách pomocí enzymů přeměněny na fluorescenční látky nesoucí náboj a ty jsou v buňce zadržovány a koncentrovány. Pokud je narušena integrita buněk, jsou tyto látky vyplavovány ven a tyto buňky pak nejsou životaschopné. Indikátorem buněčné viability je rovněž transmembránový potenciál udržovaný na cytoplazmatické membráně činností iontových pump. K měření tohoto potenciálu se používají tzv. distribuční sondy. Jde o lipofilní barviva, která mohou volně procházet cytoplazmatickou membránou do buněk a hromadí se v nich závisle na jejich náboji [61].

3 CÍLE PRÁCE

- 1) Rešerše - přehled technik enkapsulace, možnosti enkapsulace velkých polymerních molekul a mikroorganismů.
- 2) Optimalizace metod kultivace vybraných typů mléčných bakterií a jejich enkapsulace.
- 3) Optimalizace analýzy aktivity enkapsulovaných enzymů.
- 4) Experimentální studie - sledování enkapsulační účinnosti, stability částic a zachování aktivity enkapsulovaných systémů v různém prostředí.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie a přístroje

4.1.1 Chemikálie

Chitosan, Sigma-Aldrich (SRN)
Alginát sodný, Sigma-Aldrich (SRN)
Cholesterol, Sigma-Aldrich (SRN)
Tripolyfosfát sodný, Sigma-Aldrich (SRN)
Škrob rozpustný p.a., Lach-Ner (ČR)
Lecithin, Mogador (ČR)
Kyselina chlorovodíková 35%, Lach-Ner (ČR)
Hydroxid sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Chlorid vápenatý p.a., Lachema (ČR)
Močovina p.a., Penta (ČR)
Azoalbumin, Sigma-Aldrich (SRN)
Kyselina trichloroctová, Serva (SRN)
Hydrogenuhličitan sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Kyselina octová 98%, Lach-Ner (ČR)
Vinan sodno-draselný tetrahydrát, Lachema (ČR)
Uhličitan sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Síran měďnatý pentahydrát p.a., Lachema (ČR)
Folin-Ciocalteuovo činidlo, Penta (ČR)
Žlučová sůl – směs kyseliny cholové a deoxycholové, Sigma-Aldrich (ČR)
MRS bujón, HiMedia (Ind)
Agar, HiMedia (Ind)
Agarosa, Serva (SRN)
Ostatní použité chemikálie byly vesměs čistoty p.a. a byly získány od běžných dodavatelů

4.1.2 Přístroje

Analytické váhy (AND HR-120)
Centrifuga – U-32-R, Boeco (Německo)
Mikrocentrifuga – Mikro 200, Hettich Zentrifugen
Spektrofotometr – Helios γ , Unicam (UK)
Ultrazvuk – PS 02000 Ultrasonic Compact Cleaner 1,25L, PowerSonic (SR)
Ultrazvukový homogenizátor/dispergátor – Sonopuls, Bandelin
ZetaSizer Nano ZS – Malvern (UK)
Fluorescenční mikroskop (Olympus, SRN)
Optický mikroskop - Intraco Micro (ČR)
Skenovací elektronový mikroskop JEOL JSM-7600F
LUMiSizer – Dispersion analyzer – Lum
Lyofilizátor – BenchTop 4K ZL, VirTis

4.2 Použité enzymy a mikroorganismy

4.2.1 Enzymy

Jako vzorky pro enkapsulaci bylo použito 6 vybraných enzymů.

- Bromelain z ananasového stonku, Sigma-Aldrich (SRN)
- Pepsin z prasečí žaludeční sliznice, Sigma-Aldrich (SRN)
- Trypsin z prasečí slinivky břišní, Sigma-Aldrich (SRN)
- Pankreatin z prasečí slinivky břišní, Sigma-Aldrich (SRN)
- Alkaláza z *Bacillus licheniformis*, Sigma-Aldrich (SRN)
- Lipasa z *Rhizopus oryzae*, Sigma-Aldrich (SRN)

4.2.2 Použité mikroorganismy

V této práci byly použity bakteriální kultury *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833 a *Bifidobacterium breve* CCM 7825^T, které pochází z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

4.3 Příprava částic

Pro přípravu částic, které byly určeny jak pro enkapsulaci enzymů, tak pro enkapsulaci mikroorganismů byly použity především polysacharidové látky jako je chitosan, alginát, agar, agarosa, škrob a pullulan. Byly připraveny taktéž částice vzniklé kombinací uvedených látek. Pro enkapsulaci enzymů byly připraveny i liposomové částice.

4.3.1 Příprava částic pro enkapsulaci enzymů

4.3.1.1 Příprava chitosanových částic

250 mg chitosanu bylo rozpuštěno ve 40 ml vody s již rozpuštěným vzorkem na enkapsulaci a poté bylo přidáno 0,5 ml koncentrované kyseliny octové. Vzniklá směs byla ultrazvukována a po malých dávkách byly přidávány 4 ml 2% tripolyfosfátu sodného [19].

Část takto připraveného roztoku byla centrifugována a supernatant použit ke stanovení enkapsulační účinnosti pomocí metody stanovení bílkovin a enzymové aktivity a část byla použita pro stanovení stability a velikosti částic.

4.3.1.2 Příprava chitosan-alginátových částic

40 ml alginátu o koncentraci 1 mg/ml (pH roztoku bylo pomocí HCl upraveno na 5). Do alginátu byl přidán vzorek na enkapsulaci. Poté bylo do roztoku přidáváno po malých dávkách 10 ml roztoku CaCl₂ o koncentraci 3,35 mg/ml s pH upraveným na 5. V průběhu přidávání byl roztok ultrazvukován. Dále bylo k takto vzniklému roztoku přidáváno 30 ml roztoku chitosanu. Ten byl připraven rozpuštěním chitosanu v 1% kyselině octové o koncentraci 0,8 mg/ml a pH upraveno přibližně na 5 pomocí NaOH. Takto vzniklý roztok byl po malých dávkách přidáván do předchozího roztoku a celý roztok byl průběžně ultrazvukován [62].

Část takto připraveného vzorku byla centrifugována a supernatant použit ke stanovení enkapsulační účinnosti, enzymové aktivity a část byla použita pro stanovení stability a velikosti částic.

4.3.1.3 Příprava alginátových částic

3 ml 0,5% chloridu vápenatého bylo přikapáváno za stálého míchání do 10 ml 0,3% alginátu, do kterého byl před přikapáváním přidán vzorek určený pro enkapsulaci.

Část takto připraveného vzorku byla centrifugována a supernatant použit ke stanovení enkapsulační účinnosti, enzymové aktivity a část byla použita pro stanovení stability a velikosti částic.

4.3.1.4 Příprava škrobových částic

Byl připraven 1% roztok škrobu. Škrob byl rozpuštěn v roztoku NaOH a močoviny v poměru 0,8:1 (hmotnostních procent). Do takto připraveného roztoku byl přidán vzorek určený k enkapsulaci. 1 ml tohoto roztoku byl přidáván po malých dávkách do 20 ml ethanolu [63].

Část takto připraveného vzorku byla centrifugována a supernatant použit ke stanovení enkapsulační účinnosti, enzymové aktivity a část byla použita pro stanovení stability a velikosti částic.

4.3.1.5 Příprava liposomových částic

450 mg lecithinu a 50 mg cholesterolu bylo přidáno do 20 ml vody, kde byl předem rozpuštěn enzym určený pro enkapsulaci. Takto připravený roztok byl ultrazvukován po dobu 30 sekund.

Část takto připraveného vzorku byla centrifugována a supernatant použit ke stanovení enkapsulační účinnosti, enzymové aktivity a část byla použita pro stanovení stability a velikosti částic.

4.3.2 Příprava částic pro enkapsulaci mikroorganismů

4.3.2.1 Příprava alginátových částic

Při přípravě alginátových částic bylo použito 10 ml 2% chloridu vápenatého a 5 ml 2% alginátu. V 5 ml alginátu byla rozsuspodována kultura mikroorganismů a pomocí pipety po malých kapkách byl tento roztok přikapáván za stálého míchání do chloridu vápenatého.

4.3.2.2 Příprava chitosanových částic

Při přípravě chitosanových částic byl připraven 0,6 % roztok chitosanu okyselený kyselinou octovou, dále byl připraven roztok tripolyfosfátu sodného (400 mg + 20 ml H₂O). V 5 ml roztoku chitosanu byly suspendována kultura mikroorganismů a poté byl tento roztok přikapáván do roztoku tripolyfosfátu sodného.

4.3.2.3 Příprava chitosan-alginátových částic

Při přípravě alginátových částic bylo použito 10 ml 2% chloridu vápenatého a 5 ml 2% alginátu. V 5 ml alginátu byla suspendována kultura mikroorganismů a pomocí pipety po malých kapkách byl tento roztok přikapáván za stálého míchání do chloridu vápenatého. Poté byly částice odfiltrovány a za stálého míchání přidávány do 0,6% roztoku chitosanu okyselený pomocí kyseliny octové.

4.3.2.4 Příprava agarosových částic

Agarosové částice byly připraveny rozpuštěním agarosy ve vodě za vzniku 2% roztoku agarosy, který byl za teplého stavu (40 °C) pipetován do studené vody, která měla okolo 4 °C.

4.3.2.5 Příprava agarových částic

Pro přípravu agarových částic byl použit 2% roztok agaru, který byl za teplého stavu (40 °C) pipetován do studené vody s teplotou okolo 4 °C.

4.3.2.6 Příprava alginát-agarosových částic

Při přípravě alginát-agarosových částic byla připravena 4% agarosa a 2% alginát. Tyto dva roztoky byly smíchány v poměru 1:1. Ve směsi roztoků byly suspendovány buňky a poté byl roztok přikapáván do studeného 2% roztoku chloridu vápenatého.

4.3.2.7 Příprava alginát-agarových částic

Alginát-agarové částice byly připraveny smícháním 2% agaru a 2% alginátu v poměru 1:1. V tomto roztoku byla suspendována kultura mikroorganismů a poté byl roztok přikapáván do studeného 2% roztoku chloridu vápenatého.

4.3.2.8 Příprava alginát-škrobových částic

Při přípravě alginát-škrobových částic byl smíchán 4% roztok alginátu se 4% roztokem škrobu v poměru 1:1. V tomto roztoku byly suspendovány buňky a nakonec byl roztok přikapáván do 2% chloridu vápenatého.

4.3.2.9 Příprava alginát-pululanových částic

Při přípravě alginát-pululanových částic byl smíchán 4% roztok pululanu a 4% roztok alginátu v poměru 1:1. V tomto roztoku byly suspendovány buňky a roztok byl přikapáván do 2 % roztoku chloridu vápenatého.

4.4 Stanovení enkapsulační účinnosti

4.4.1 Stanovení enkapsulační účinnosti u enkapsulovaných enzymů

Enkapsulační účinnost enzymů byla stanovena s využitím stanovení koncentrace bílkovin Hartree-Lowryho metodou a pomocí stanovení enzymové aktivity.

Při stanovení enkapsulační účinnosti Hartree-Lowryho metodou byla nejprve změřena koncentrace bílkovin v roztoku, ve kterém byl rozpuštěn enzym určený pro enkapsulaci. Poté byl enzym enkapsulován a částice byly centrifugovány. V supernatantu byla stanovena zbytková koncentrace bílkovin a použita k výpočtu množství enkapsulovaných bílkovin.

Při stanovení enkapsulační účinnosti pomocí enzymové aktivity byla změřena enzymová aktivita nejprve v roztoku enzymu, který byl určen pro enkapsulaci. Poté byl enzym enkapsulován, částice odcentrifugovány a byla změřena zbylá enzymová aktivita v supernatantu.

4.4.1.1 Stanovení koncentrace bílkovin Hartree-Lowryho metodou

Pro stanovení bílkovin byla použita Hartree-Lowryho metoda. K 1 ml vzorku obsahujícího enzym bylo přidáno 0,9 ml Hartree-Lowryho činidla A. Roztok byl inkubován ve vodní lázni při 50 °C po dobu 10 minut. Poté byl roztok ochlazen a přidáno 0,1 ml Hartree-Lowryho

činidla B, roztok byl protřepán a inkubován při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Nakonec byly přidány 3 ml Folin-Ciocalteuova činidla a směs byla inkubována 10 minut ve vodní lázni při 50 °C. Nakonec byl roztok ochlazen a změřena absorbance při 650 nm [64]. Složení činidel:

Roztok A: 2 g Vinan sodno-draselný . 4 H₂O, 100 g Na₂CO₃, 500 ml 1M NaOH,
doplnit destilovanou vodou do 1 l

Roztok B: 2 g Vinan sodno-draselný . 4 H₂O, 1 g CuSO₄ . 5 H₂O, 10 ml 1M NaOH

Roztok C: Folin-Ciocalteuovo činidlo: dest. voda (1:15)

4.4.1.2 Stanovení kalibrační křivky albuminu

Pro sestrojení kalibrační křivky byl použit roztok albuminu, z něhož byla připravena kalibrační řada o koncentraci 0,15 až 0,75 mg/ml. Do každé zkumavky bylo k 1 ml roztoku albuminu přidáno 0,9 ml roztoku A, zkumavky byly temperovány po dobu 10 minut při 50 °C ve vodní lázni. Pak byly zkumavky ochlazeny a bylo přidáno 0,1 ml roztoku B, při laboratorní teplotě se zkumavky temperovaly 10 minut. Poté byly přidány 3 ml roztoku C a opět se zkumavky temperovaly po dobu 10 minut ve vodní lázni při 50 °C. Nakonec byla změřena absorbance při 650 nm proti blanku, kde byl roztok albuminu nahrazen destilovanou vodou.

4.4.1.3 Stanovení enzymových aktivit

Při stanovení proteázové aktivity bromelainu, trypsinu, pepsinu, alkalázy a pankreatinu byl jako substrát použit roztok azoalbuminu (5 mg/ml). Azoalbumin je chemicky modifikovaný protein s navázanou oranžovou sulfanilamidovou skupinou. Enzymatickou hydrolýzou (37 °C) se uvolňují barevné peptidy rozpustné v trichloroctové kyselině, které jsou následně detekovány při 440 nm. Jednotka aktivity je pak definována jako množství enzymu katalyzující přeměnu substrátu doprovázenou nárůstem absorbance o 0,001 za 1 minutu za podmínek testu [65].

0,1 ml substrátu bylo smícháno s 0,1 ml supernatantu a inkubováno při 37 °C po dobu 30 minut. Reakce byla zastavena přidavkem 0,41 ml 10% trichloroctové kyseliny, poté vzorky centrifugovány. K 0,5 ml získaného supernatantu bylo v kyvetě přidáno 0,7 ml 1M NaOH a změřena absorbance při 440 nm proti blanku.

Stanovení lipolytické aktivity s využitím p-nitrofenylpalmitátu je založeno na schopnosti lipolytických enzymů štěpit tento substrát za vzniku žlutě zbarveného produktu p-nitrofenolu. Při stanovení lipásové aktivity bylo 1,25 ml substrátu (0,0135 g p-nitrofenyl palmitát, 0,017 g SDS, 1 g triton X-100) smícháno s 1,25 ml pufru o pH = 8 a s 0,5 ml vzorku. Takto vzniklý roztok byl inkubován při 55 °C po dobu 5 minut. Poté byla absorbance změřena při 410 nm proti blanku.

4.5 Stanovení velikosti částic

Velikost částic byla stanovena pomocí přístroje ZetaSizer Nano ZS. Roztok částic byl naředěn na vhodnou koncentraci a změřen v kyvetách. Ze dvou měření byla vypočítána průměrná hodnota velikosti částic.

4.6 Stanovení stability částic

Stabilita částic byla změřena stejně jako velikost částic na přístroji ZetaSizer Nano ZS pomocí Zeta Dipp Cely. Před vlastním měřením Zeta Dipp Cely ponořena do roztoku v kyvetě. Každý vzorek byl proměřen dvakrát a vypočítaná průměrná hodnota.

4.7 Stanovení stability částic v modelových tělních tekutinách

Stabilita částic byla stanovena v žaludeční, pankreatické a žlučové šťávě. Vzorky byly připraveny v poměru 1:1 (šťáva:částice) a byl změřen zeta potenciál a koncentrace bílkovin v čase nula a po 15 minutách u pankreatické a žaludeční šťávy a po 30 minutách u žlučové šťávy.

4.7.1 Složení modelové pankreatické šťávy

Pankreatická šťáva byla připravena rozpuštěním 0,25 g pankreatinu a 1,5 g NaHCO₃ ve 100 ml destilované vody, pH bylo upraveno na cca 8,9 [66].

4.7.2 Složení modelové žaludeční šťávy

Žaludeční šťáva byla připravena z 0,25 g pepsinu, který byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. Následně bylo přidáno 0,84 ml 35% kyseliny chlorovodíkové a hodnota pH byla upravena na hodnotu 0,9 [66].

4.7.3 Složení modelové žlučové šťávy

Žlučová šťáva byla nachystána přidáním 0,8 g žlučových solí do 200 ml pufru o pH 8 [66].

4.8 Stanovení stability částic v simulovaných potravinách

Simulantem potravin je zkušební roztok přesně definovaného složení a přesně definovaných vlastností, nahrazující určitou potravinu nebo skupinu potravin. Pro potraviny s pH vyšším než 4,5 byla použita voda. Pro potraviny s pH nižším než 4,5 byla připraven 3% roztok kyseliny octové. Pro potraviny a nápoje s alkoholem byl připraven 10% roztok ethanolu. Pro tukové potraviny byl použit jako modelový roztok olej smíchaný s vodou v poměru 1:1 [67].

Částice byly ponechány jeden týden ve čtyřech modelových typech potravin a v průběhu testování byla sledována stabilita částic pomocí proměření zeta potenciálu (0 dní, 7 dní).

4.9 Stanovení vlastností pomocí analytické centrifugace

Pro analytickou centrifugaci byl použit vzorek po enkapsulaci bez jakýchkoliv dalších úprav. Byly použity jak částice bez enkapsulovaného enzymu, tak částice s enkapsulovaným enzymem. Vzorek částic byl napipetován do kyvet určených pro analytickou centrifugaci, byly nastaveny vhodné otáčky v kombinaci s dobou centrifugace a spuštěno měření. Při centrifugaci byla snímána měnící se transmitance vzorku v kyvetě. Výsledky byly zobrazeny v grafech závislosti transmitance na pozici v kyvetě, což odpovídá rychlosti sedimentace daných částic.

4.10 Kultivace mikroorganismů

Pro kultivaci bakteriálních kultur *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve* bylo použito komerční MRS médium. V případě uchovávání mikroorganismu na pevném médiu byl do média přidán agar. Sterilizace média probíhala v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 30 minut. Kultury byly zaočkovány z Petriho misky do 50 ml sterilního média ve 100 ml Erlenmayerově baňce. Z takto připraveného inokula bylo po 24 hodinách zaočkováno růstové médium (2 ml do 50 ml sterilního média ve 100 ml Erlenmayerově baňce). Kultivace probíhala při teplotě 37°C po dobu 48 hodin, poté byly kultury použity na enkapsulaci.

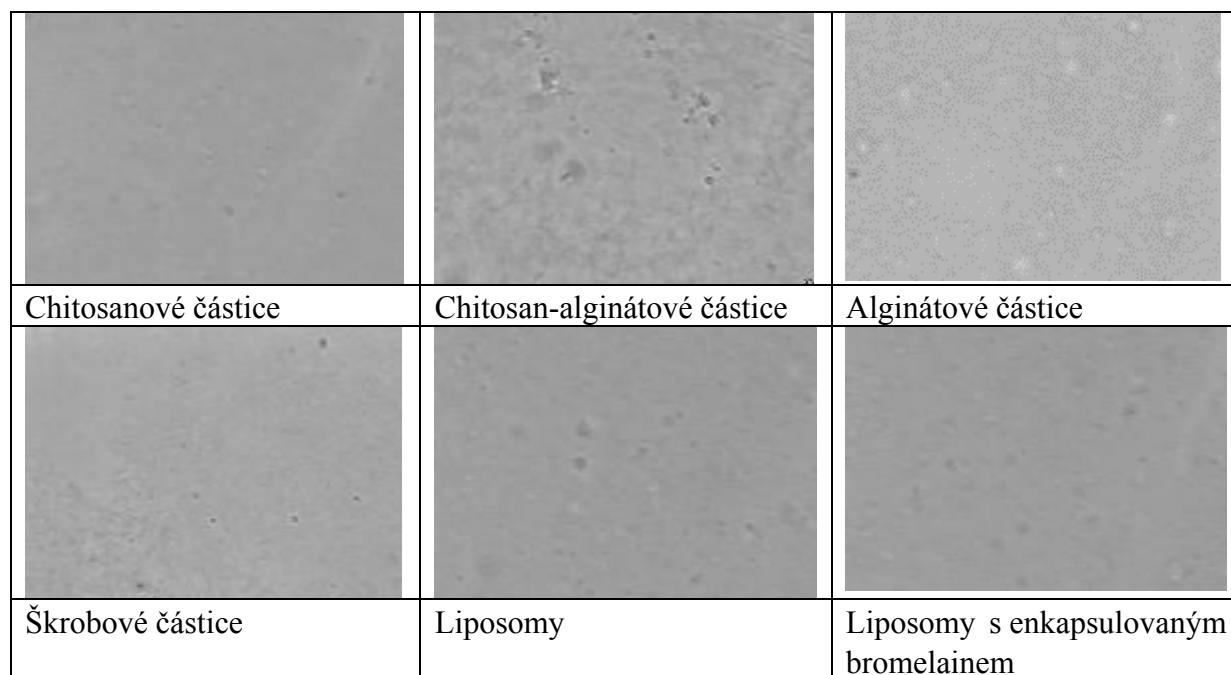
4.11 Stanovení viability a počtu buněk pomocí průtokové cytometrie

Ke stanovení viability a počtu buněk bylo využito průtokové cytometrie. 1 ml kultury bylo centrifugováno při 6 000 otáčkách po dobu 4 minut. Po centrifugaci byly buňky suspendovány v destilované vodě a naředěny. Takto připravený roztok byl použit pro stanovení počtu buněk. Při stanovení viability bylo do takto připraveného roztoku napipetováno potřebné množství propidiumjodidu k obarvení mrtvých buněk. Po 20 minutách byla změřena viabilita buněk v tomto roztoku.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Vizualizace částic pomocí optického mikroskopu

Připravené částice byly průběžně zobrazovány pomocí optického mikroskopu (zvětšení 640x). Na Obr. 21 je ukázka některých typů částic v původní koncentraci, bez jakýchkoliv dalších úprav vzorku. Snímky byly zpracovány pomocí software Lucia.



Obr. 21 Ukázka připravených částic

5.2 Enkapsulace enzymů

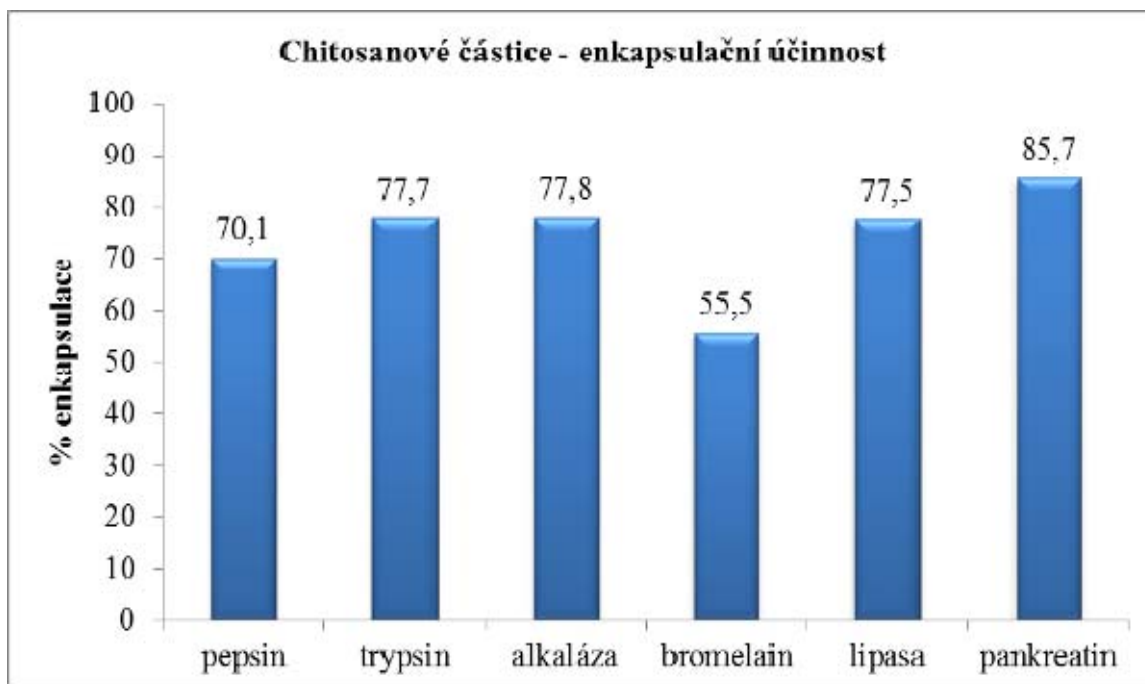
5.2.1 Stanovení enkapsulační účinnosti pomocí stanovení koncentrace bílkovin

Hodnocení enkapsulační účinnosti s využitím stanovení koncentrace bílkovin bylo popsáno v předchozí kapitole (viz kap. 4.4.1.1). Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a z nich byla vypočtena průměrná koncentrace bílkovin. Z rozdílu výchozí koncentrace bílkovin v roztoku enzymu a koncentrace bílkovin v supernatantu po centrifugaci částic bylo vypočteno procento enkapsulovaného enzymu. Výsledky jsou zaznamenány v následujících tabulkách a grafech.

5.2.1.1 Enkapsulační účinnost u chitosanových částic

Chitosanové částice byly připraveny podle postupu uvedeného v metodické části (viz kap. 4.3.1.1) a sloužily k enkapsulaci pepsinu, trypsinu, alkalázy, bromelainu, lipasy a pankreatinu. Enkapsulační účinnost u chitosanových částic se pohybovala v rozmezí od 55,5 do 85,7 %. Nejvyšší enkapsulační účinnost byla zaznamenána u enzymu pankreatinu, nejmenší u bromelainu. U enzymů trypsinu, alkalázy a pepsinu byla naměřena téměř stejná enkapsulační účinnost.

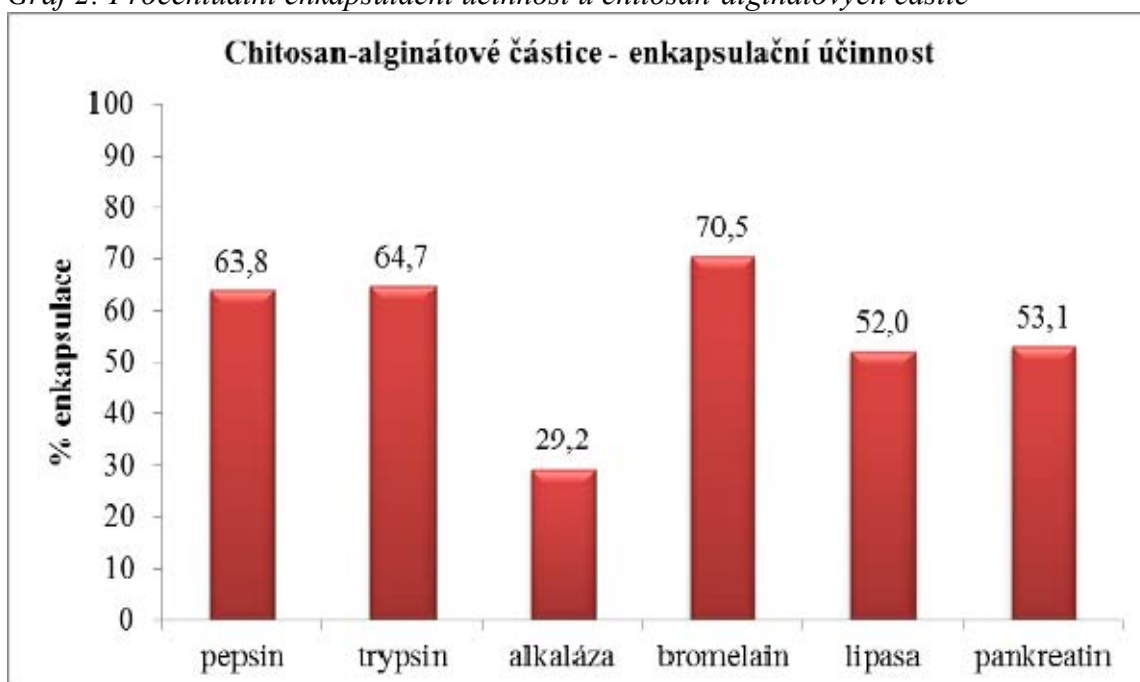
Graf 1: Procentuální enkapsulační účinnost u chitosanových částic



5.2.1.2 Enkapsulační účinnost u chitosan-alginátových částic

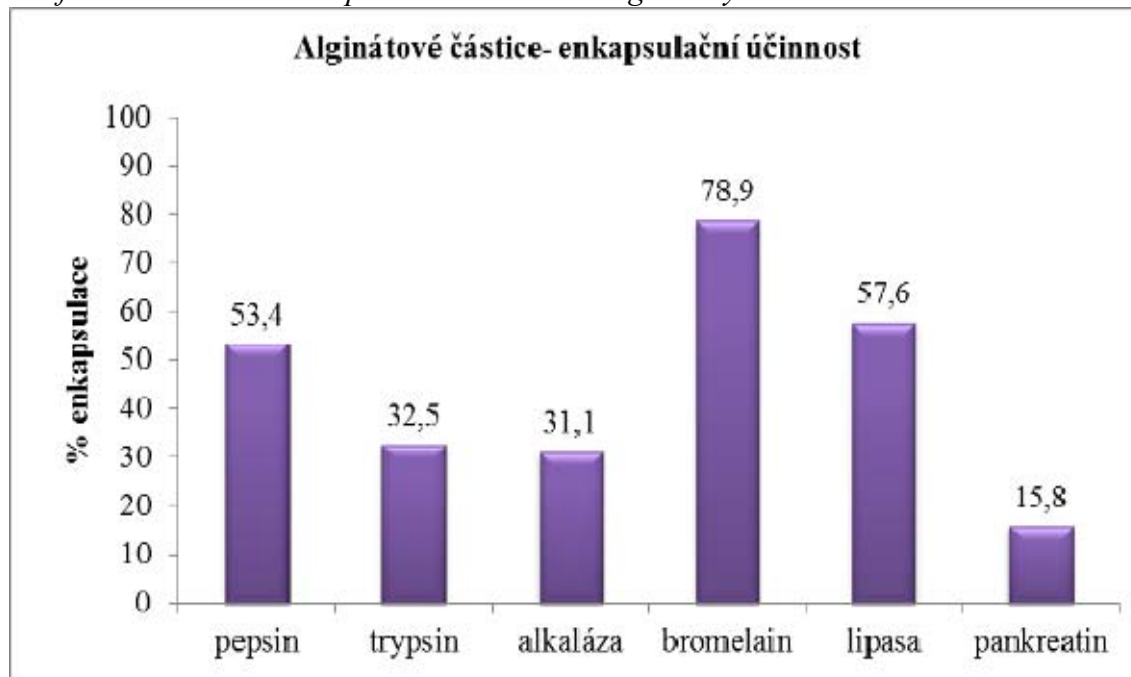
Chitosan-alginátové částice byly připraveny postupem uvedeného v metodické části (viz kap. 4.3.1.2). Částice sloužily opět k enkapsulaci pepsinu, trypsinu, alkalázy, bromelainu, lipasy a pankreatinu. Enkapsulační účinnost u těchto částic byla 29,2 až 70,5 %, přičemž nejvyšší enkapsulační účinnost byla naměřena u enzymu bromelainu a nejmenší u alkalázy. Enzym pepsin a trypsin byly enkapsulovány se stejnou účinností stejně jako lipasa a pankreatin.

Graf 2: Procentuální enkapsulační účinnost u chitosan-alginátových částic



5.2.1.3 Enkapsulační účinnost u alginátových částic

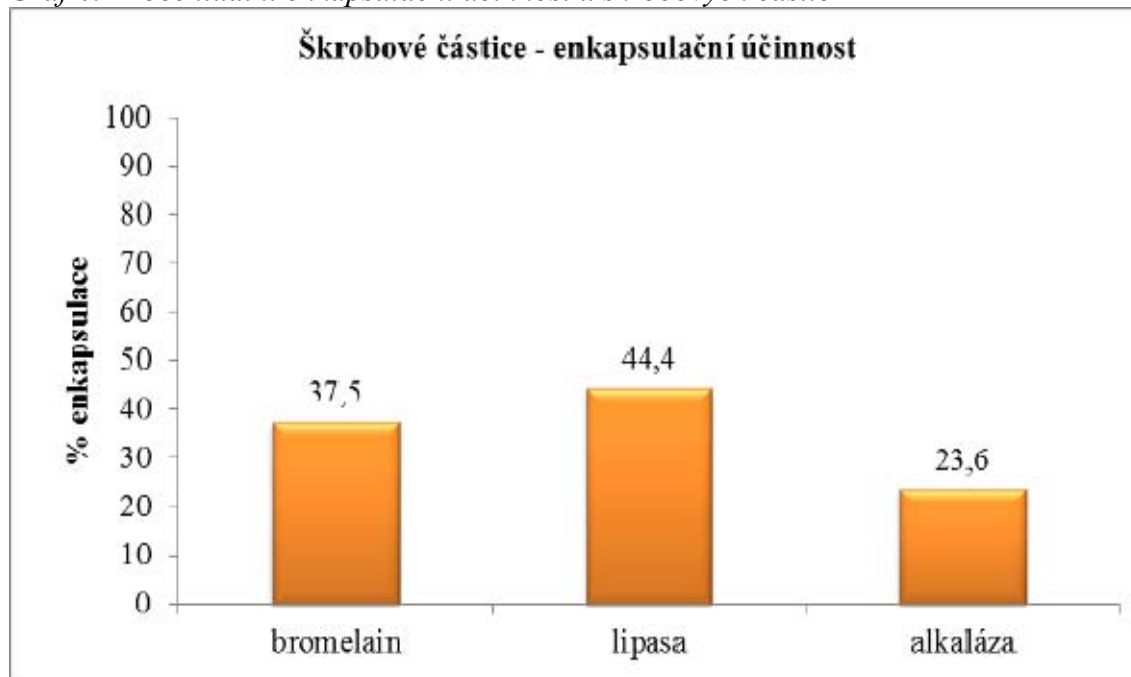
Graf 3: Procentuální enkapsulační účinnost u alginátových částic



Příprava alginátových částic byla popsána v metodice (viz kap. 4.3.1.3). Enkapsulační účinnost se pohybovala v rozmezí od 15,8 do 78,9 %. Nejvyšší enkapsulační účinnost byla naměřena u enzymu bromelainu, nejmenší naopak u enzymu pankreatinu. Enkapsulační účinnost lipasy a pepsinu byla podobná stejně jak enkapsulační účinnost u enzymů trypsinu a alkalázy.

5.2.1.4 Enkapsulační účinnost u škrobových částic

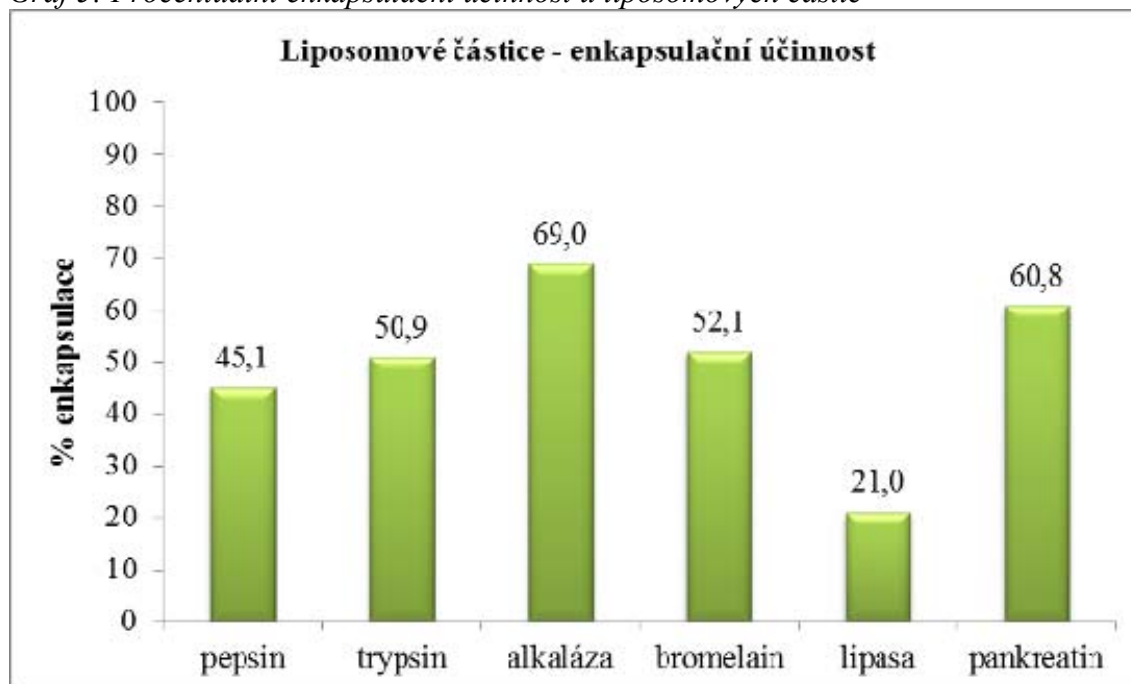
Graf 4: Procentuální enkapsulační účinnost u škrobových částic



Příprava škrobových částic byla popsána v kap. 4.3.1.4. Enkapsulační účinnost škrobových částic byla poměrně nízká, v rozmezí od 23,6 do 44,4 %. Nejvyšší enkapsulační účinnost byla zaznamenána u enzymu lipasy, nejmenší u enzymu alkalázy. Bromelain, který byl třetím enkapsulovaným enzymem ve škrobových částicích byl enkapsulován z 37,5 %.

5.2.1.5 Enkapsulační účinnost u liposomových částic

Graf 5: Procentuální enkapsulační účinnost u liposomových částic



Příprava liposomových částic byla popsána v metodické části (viz kap. 4.3.1.5). Enkapsulační účinnost byla stanovena pomocí změny koncentrace bílkovin stejně jako u chitosanových, chitosan-alginátových a alginátových částic u enzymů pepsinu, trypsinu, alkalázy, bromelainu, lipasy a pankreatinu. Enkapsulační účinnost byla u liposomových částic od 21,0 do 69,0 %. Nejvyšší enkapsulační účinnost byla naměřena u enzymu alkalázy a nejmenší u lipasy. Hranice nad 50 % enkapsulační účinnosti byla překročena u trypsinu, bromelainu a pankreatinu. Enkapsulační účinnost pod 50 % byla naměřena u pepsinu a již zmiňované lipasy.

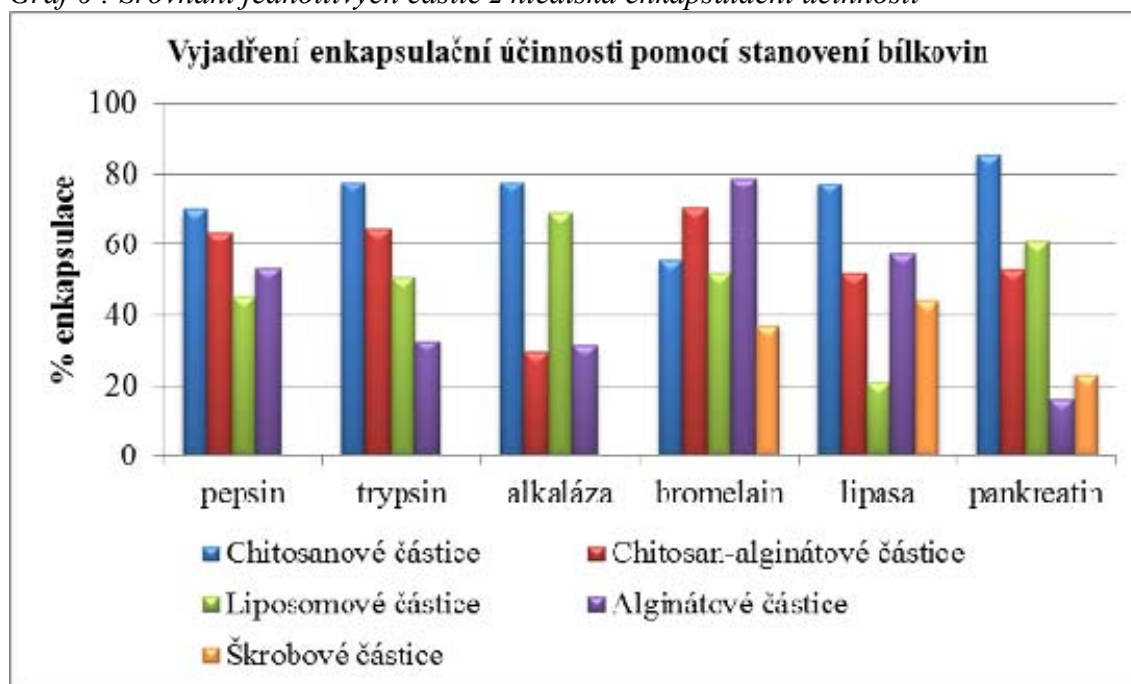
5.2.1.6 Srovnání enkapsulační účinnosti v rámci všech částic

Tab. 2 Procentuální enkapsulace u jednotlivých typů částic

	CH [%]	CHA [%]	A [%]	L [%]	Š [%]
Pepsin	70,1	63,8	53,4	45,1	-
Trypsin	77,7	64,7	32,5	50,9	-
Bromelain	77,8	29,2	31,1	69,0	37,5
Alkaláza	55,5	70,5	78,9	52,1	23,6
Lipasa	77,5	52,0	57,6	21,0	44,4
Pankreatin	85,7	53,1	15,8	60,8	-

Pozn.: CH – chitosanové částice, CHA – chitosan-alginátové částice, A – alginátové částice, L – liposomové částice, Š – škrobové částice

Graf 6 : Srovnání jednotlivých částic z hlediska enkapsulační účinnosti



Celkovou nejvyšší enkapsulační účinnost u pepsinu, trypsinu, alkalázy, lipasy a pankreatinu vykazují chitosanové částice, výjimkou je enzym bromelain. Do chitosan-alginátových částic byl s více než 50 % enkapsulační účinností enkapsulován pepsin, trypsin, lipasa, pankreatin a bromelain, který měl nízkou enkapsulační účinnost v chitosanových částicích. Enkapsulační účinnost pod 30 % u chitosan-alginátových částic byla zaznamenána u enzymu alkalázy. Liposomové částice vykazují enkapsulační účinnost nad 50 % u enzymů trypsinu, alkalázy, bromelainu a pankreatinu. Naopak enzym lipasa byl enkapsulován pod hranicí 30 %. Alginátové částice vykazují nejvyšší enkapsulační účinnost u enzymu bromelainu a nejnižší u enzymu pankreatinu. Škrobové částice a jejich enkapsulační účinnost se pohybovala pod hranicí 50 % u všech naměřených enzymů. Nejvhodnější pro enkapsulaci enzymů z celkového hlediska jsou tedy chitosanové a chitosan-alginátové částice, nejméně vhodné jsou potom škrobové částice.

Je třeba konstatovat, že v současné době jsou již na trhu k dispozici přístroje na přípravu částic, tzv. enkapsulátory, případně nanosprejové sušárny (výrobce př. Büchi, Švýcarsko). Lze předpokládat, že účinnost enkapsulace by se mohla s využitím těchto přístrojů dále zvýšit. Některé z nich však nejsou vhodné pro enkapsulaci termolabilních látek.

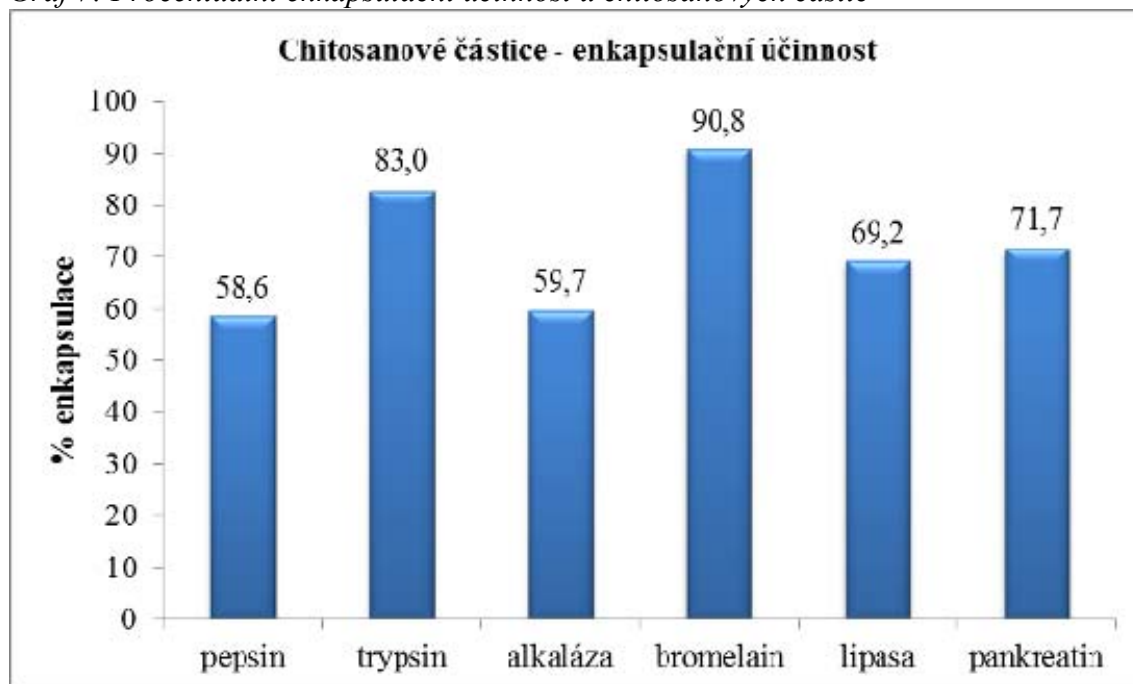
5.2.2 Stanovení enkapsulační účinnosti pomocí enzymové aktivity

Stanovení enkapsulační účinnosti s využitím vyhodnocení enzymové aktivity bylo provedeno postupem, který je popsán v metodické části (kap. 4.4.1.2). Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a z nich byla vypočtena průměrná enzymová aktivita. Z hodnot enzymové aktivity v původním roztoku enzymu a enzymové aktivity v supernatantu po odstředění částic byla vypočtena procentuální enkapsulace, která je uvedena v následujících tabulkách a grafech.

5.2.2.1 Enkapsulační účinnost u chitosanových částic

Enkapsulační účinnost u chitosanových částic, která byla stanovena pomocí enzymové aktivity se pohybovala v rozmezí od 59,7 do 90,8 %. Všechny enkapsulované enzymy vykazují více než 50% enkapsulaci. Nejvyšší enkapsulační účinnost byla zaznamenána u enzymu bromelainu, nejmenší u pepsinu. Vysoká enkapsulační účinnost byla naměřena u trypsinu (83,0 %).

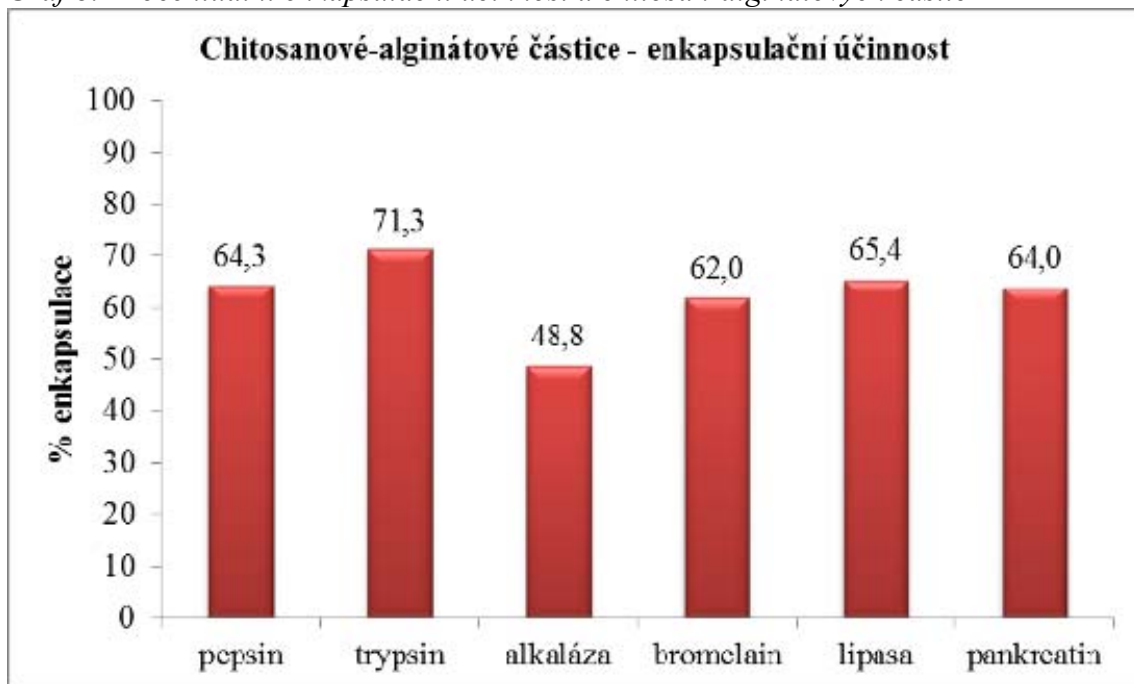
Graf 7: Procentuální enkapsulační účinnost u chitosanových částic



5.2.2.2 Enkapsulační účinnost u chitosan-alginátových částic

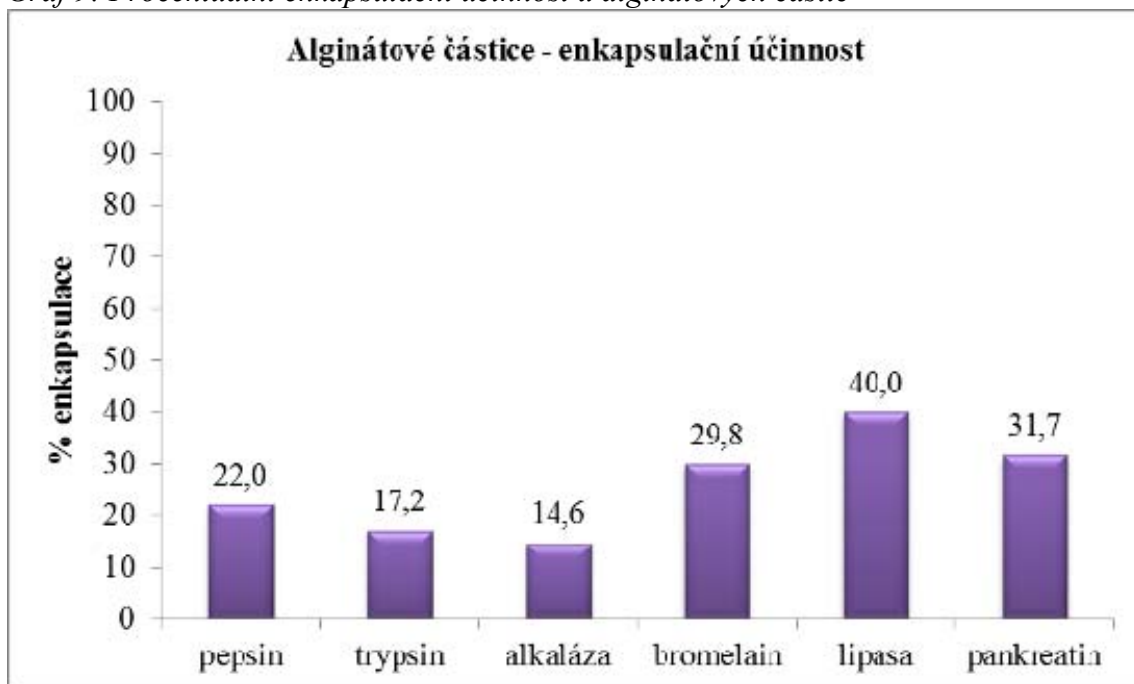
V grafu 8 je znázorněna enkapsulační účinnost při enkapsulaci enzymů do chitosan-alginátových částic naměřená pomocí enzymové aktivity. Enkapsulační účinnost se u těchto typů částic pohybovala v rozmezí od 48,8 do 71,3 %. Nejvyšší enkapsulační účinnost byla naměřena u trypsinu, nejmenší u alkalázy. U enzymů pepsinu, bromelalinu, lipasy a pankreatinu byla zjištěna velmi podobná enkapsulační účinnost, a to v rozmezí od 62,0 do 65,4 %.

Graf 8: Procentuální enkapsulační účinnost u chitosan-alginátových částic



5.2.2.3 Enkapsulační účinnost u alginátových částic

Graf 9: Procentuální enkapsulační účinnost u alginátových částic



Enkapsulační účinnost, která byla naměřena pomocí enzymové aktivity, se pohybovala u alginátových částic s enkapsulovanými enzymy v rozmezí od 14,6 do 40,0 %. U všech použitých enzymů určených na enkapsulaci byla enkapsulační účinnost poměrně nízká, vždy pod hranicí 50 %. Nejvyšší enkapsulační účinnost u těchto typů částic byla naměřena

u enzymu lipasy a nejmenší u enzymu alkalázy. Enkapsulační účinnost u enzymů pepsinu a trypsinu se pohybovala pod hranicí 25 %.

5.2.2.4 Enkapsulační účinnost u škrobových částic

Graf 10: Procentuální enkapsulační účinnost u škrobových částic



Enkapsulační účinnost u škrobových částic vyjádřená pomocí enzymové aktivity byla stanovena u tří enzymů, které vykazovaly enzymovou aktivitu v ethanolu. Nejvyšší enkapsulační účinnost byla zaznamenána u enzymu alkalázy, a to 70,6 %. U bromelainu a lipasy byla enkapsulační účinnost velmi podobná, u lipasy byla 57,1 % a u enzymu bromelainu 56,3 %.

5.2.2.5 Enkapsulační účinnost u liposomových částic

Graf 11: Procentuální enkapsulační účinnost u liposomových částic



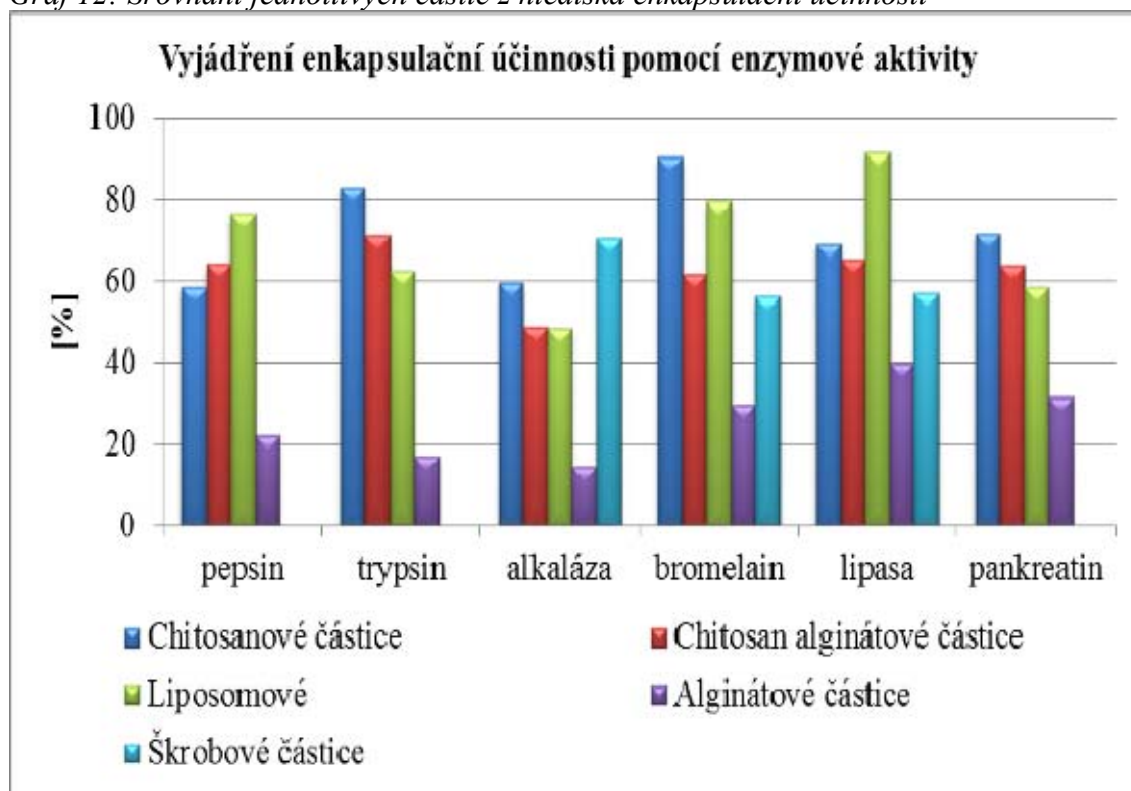
Enkapsulační účinnost u liposomových částic vyjádřená pomocí enzymové aktivity se pohybovala v rozmezí 48,5 až 91,8 %. Nejvyšší enkapsulační účinnost byla zaznamenána u enzymu lipasy, nejmenší u enzymu alkalázy. Kromě alkalázy byly všechny enzymy enkapsulovány v liposomových částicích z více než 50 %.

5.2.2.6 Srovnání enkapsulační účinnosti enzymů u všech typů částic

Tab. 3 Procentuální enkapsulace u jednotlivých typů částic

	CH [%]	CHA [%]	A [%]	L [%]	Š [%]
Pepsin	58,6	64,3	22,0	76,6	-
Trypsin	83,0	71,3	17,2	62,8	-
Bromelain	90,8	62,0	29,8	79,6	56,3
Alkaláza	59,7	48,8	14,6	48,5	70,6
Lipasa	69,2	65,4	40,0	91,8	57,1
Pankreatin	71,7	64,0	31,7	58,7	-

Graf 12: Srovnání jednotlivých částic z hlediska enkapsulační účinnosti

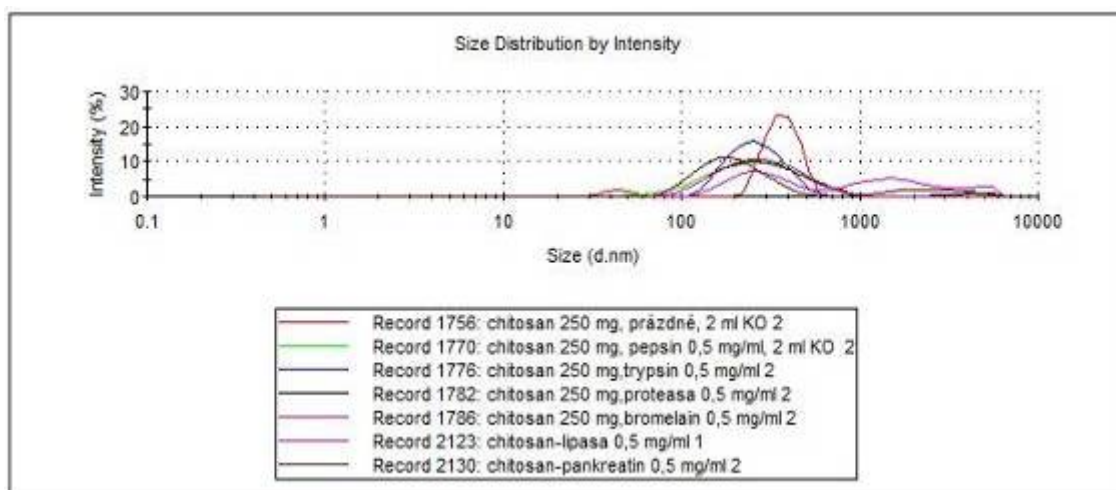


Celkovou nejvyšší enkapsulační vykazují liposomové částice u enzymu lipasy, dále chitosanové částice u enzymu bromelainu a trypsinu. Z celkového hlediska dochází k dobré enkapsulaci u liposomových a chitosanových částic. Příznivá enkapsulace byla naměřena u chitosan-alginátových částic. Nejhůře ze všech proměřených částic vykazovaly enkapsulační účinnost alginátové částice. Z pohledů enzymových aktivit se nejhůře enkapsulovaly enzymy pankreatin a alkaláza, naopak nejlépe bromelain, lipasa, poté pepsin s trypsinem.

Obecně lze říci, že hodnocení enkapsulační účinnosti pomocí enzymových aktivit poskytuje v některých případech poněkud odlišné hodnoty než u hodnocení pomocí koncentrace bílkovin. Důvodem může být mimo jiné interference složek enkapsulační směsi s činidly používanými u jednotlivých stanovení.

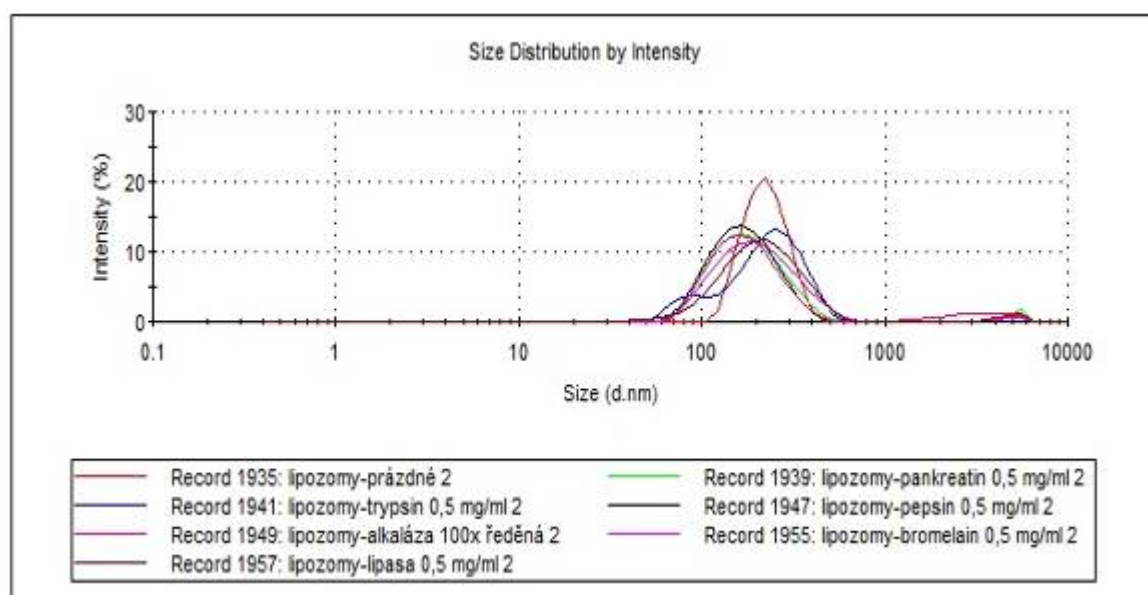
5.2.3 Stanovení velikosti částic u enkapsulovaných enzymů

Velikost částic byla stanovena postupem uvedeným v metodické části (viz kap. 4.5) pomocí přístroje ZetaSizer Nano ZS. Na následujících obrázcích jsou znázorněny záznamy analýzy velikosti částic.



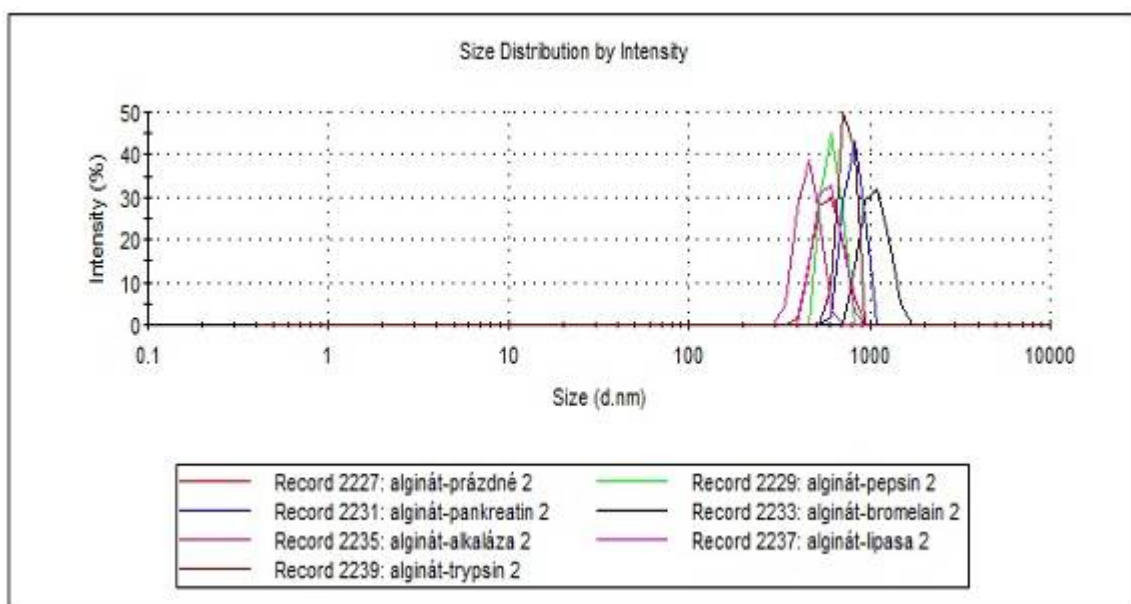
Obr. 22 Velikost chitosanových částic

Průměrná velikost chitosanových částic bez enkapsulovaných enzymů byla 441,5 nm. Po enkapsulaci enzymů do tohoto typu částic došlo k mírnému poklesu velikosti částic, a to v rozmezí od 167,2 nm do 251,1 nm.



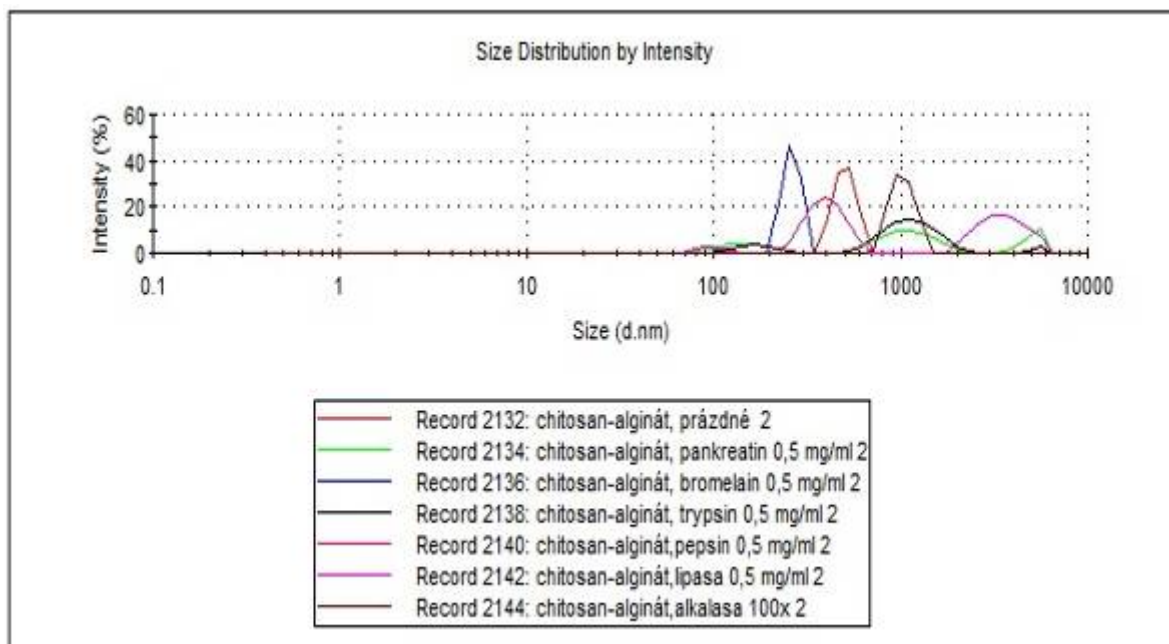
Obr. 23 Velikost liposomových částic

Průměrná velikost liposomových částic bez enkapsulovaných enzymů byla 248,3 nm. Velikost částic s enkapsulovanými enzymy byla opět nižší než u částic, které enzymy neobsahovaly. Velikost částic s enzymy se pohybovala od 156,5 nm do 219,3 nm.



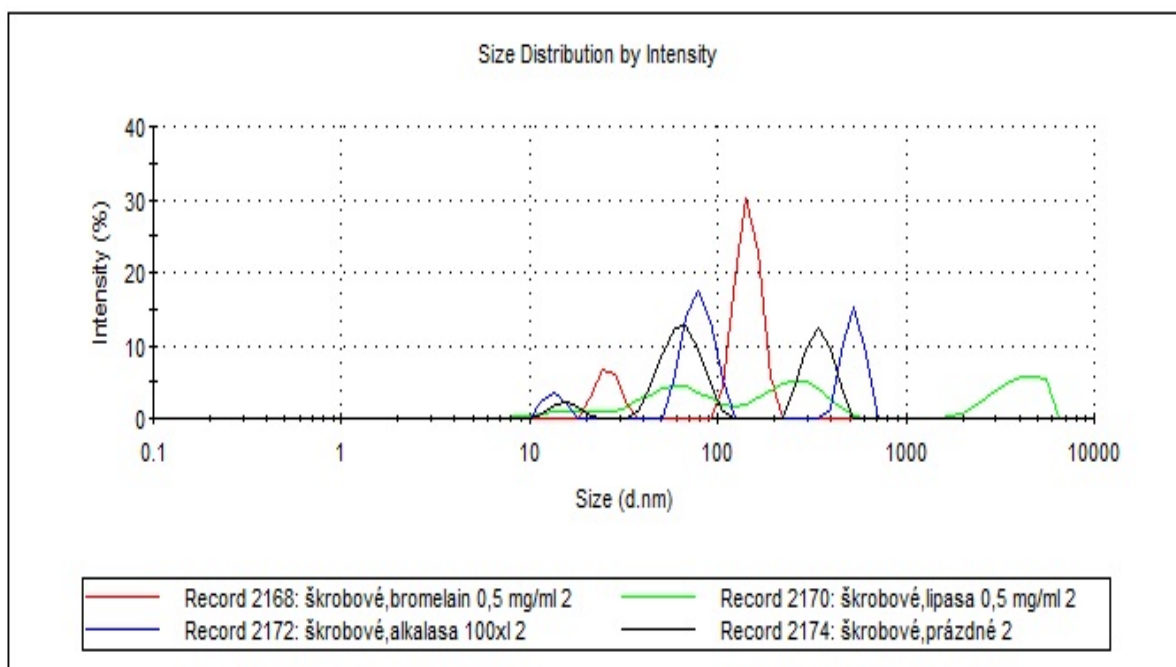
Obr. 24 Velikost alginátových částic

Průměrná velikost alginátových částic bez enkapsulovaných enzymů byla 597,6 nm. Velikost alginátových částic s enkapsulovanými enzymy se pohybovala v rozmezí od 459,7 nm do 765,0 nm, přičemž větší velikost částic než u částic bez enzymů byla naměřena u částic s enkapsulovaným enzymem trypsinem, pepsinem a pankreatinem.



Obr. 25 Velikost chitosan-alginátových částic

Velikost chitosan-alginátových částic byla spíše neměřitelná. U chitosan alginátových částic docházelo k rozpadu a tento jev se projevoval i na distribuci velikosti částic. Průměrná velikost chitosan-alginátových částic bez enkapsulovaných enzymů se pohybovala pravděpodobně okolo 715,5 nm a u částic s enkapsulovanými enzymy byla velikost pravděpodobně v rozmezí od 743,3 do 1503 nm.



Obr. 26 Velikost škrobových částic

Stejný problém jak u chitosan-alginátových částic byl zaznamenán i u škrobových částic. Nestabilita škrobových částic měla významný vliv na distribuci velikosti částic.

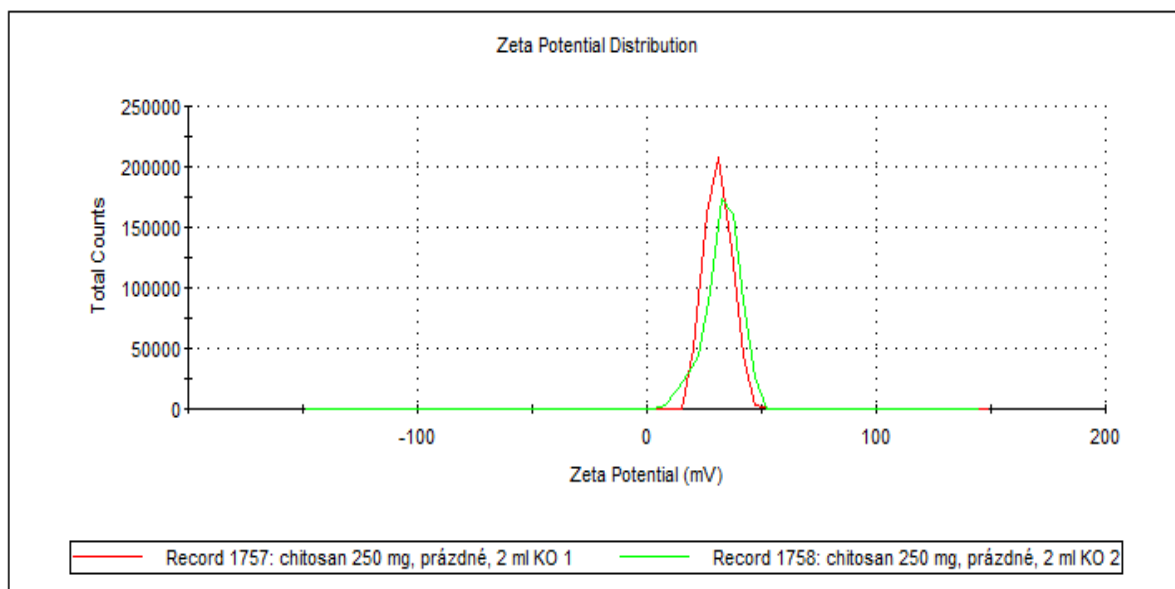
Tab. 4 Velikost částic - srovnání

	prázdňé	pepsin	trypsin	alkaláza	lipasa	pankreatin	bromelain
CH [nm]	441,5	167,2	251,1	236,2	451,8	187,6	221,3
A [nm]	597,6	615,9	765,0	459,7	591,7	615,2	542,7
CHA [nm]	715,5	888,2	802,2	1281	1503	743,3	1372
L [nm]	248,3	156,5	219,3	173,5	198,7	180,9	178,1
Š [nm]	521,9	-	-	956,7	151,8	-	808,2

Velikost částic byla stanovena u chitosanových, chitosan-alginátových, alginátových, liposomových a škrobových částic. Největší velikost prázdňých částic byla naměřena u chitosan-alginátových částic, které jsou dvojrvtvé. Nejmenší částice byly liposomové. Velikost prázdňých částic se pohybovala v rozmezí od 248,3 nm do 715,5 nm.

5.2.4 Stanovení stability částic

Stabilita částic byla stanovena postupem uvedeným v metodické kapitole (viz kap. 4.6) pomocí přístroje ZetaSizer Nano ZS. Na následujícím obrázku (obr. 13) je uvedena ukázka záznamu analýzy zeta potenciálu použitého ke stanovení stability částic.



Obr. 27 Ukázka grafu při stanovení stability částic – prázdné chitosanové částice

Stabilita částic byla stanovena u chitosanových, alginátových, chitosan-alginátových, liposomových a škrobových částic. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 5.

Tab. 5 Stabilita částic vyhodnocená pomocí zeta potenciálu

	prázdné	pepsin	trypsin	alkaláza	lipasa	pankreatin	bromelain
CH [nm]	33,1	30,2	28,5	30,4	39,1	35,3	31,5
A [nm]	-14,6	-24,3	-18,2	-25,7	-27,1	-24,2	-25,4
CHA [nm]	-29,6	-8,5	0,4	-2,3	-10,0	-12,0	-5,7
L [nm]	-57,7	-53,9	-58,6	-46,4	-61,0	-58,2	-56,0
Š [nm]	-16,8	-	-	-15,6	-17,9	-	-22,4

U prázdných chitosanových částic byl zeta potenciál 33,1 mV, což značí stabilitu koloidního roztoku. Po enkapsulaci enzymů do chitosanových částic došlo k mírnému poklesu zeta potenciálu částic u enkapsulovaných enzymů pepsinu, trypsinu, alkalázy a bromelainu. Vzestup zeta potenciálu byl pozorován u chitosanových částic s enkapsulovanou lipasou.

U roztoku s prázdnými alginátovými částicemi byl naměřen zeta potenciál -14,6 mV, což je spíše nestabilní systém, ovšem po enkapsulaci enzymů došlo k nárůstu zeta potenciálu koloidních roztoků a tím ke stabilizaci částic. Opačný případ byl pozorován u chitosan-alginátových částic, kde u roztoku s prázdnými částicemi byl naměřen zeta potenciál -29,6 mV a po enkapsulaci enzymů se zeta potenciál pohyboval v rozmezí od 0,4 do -12,0 mV.

Prázdné liposomové částice vykazovaly velmi vysokou stabilitu se zeta potenciálem -57,7 mV. Po enkapsulaci enzymů do těchto liposomových částic se stabilita zvýšila u enzymu trypsinu, lipasy a pankreatinu. Naopak snížení stability bylo zaznamenáno u enkapsulovaných enzymů alkalázy, pepsinu a bromelainu. U škrobových částic se zeta potenciál pohyboval v hodnotách mírné nestability.

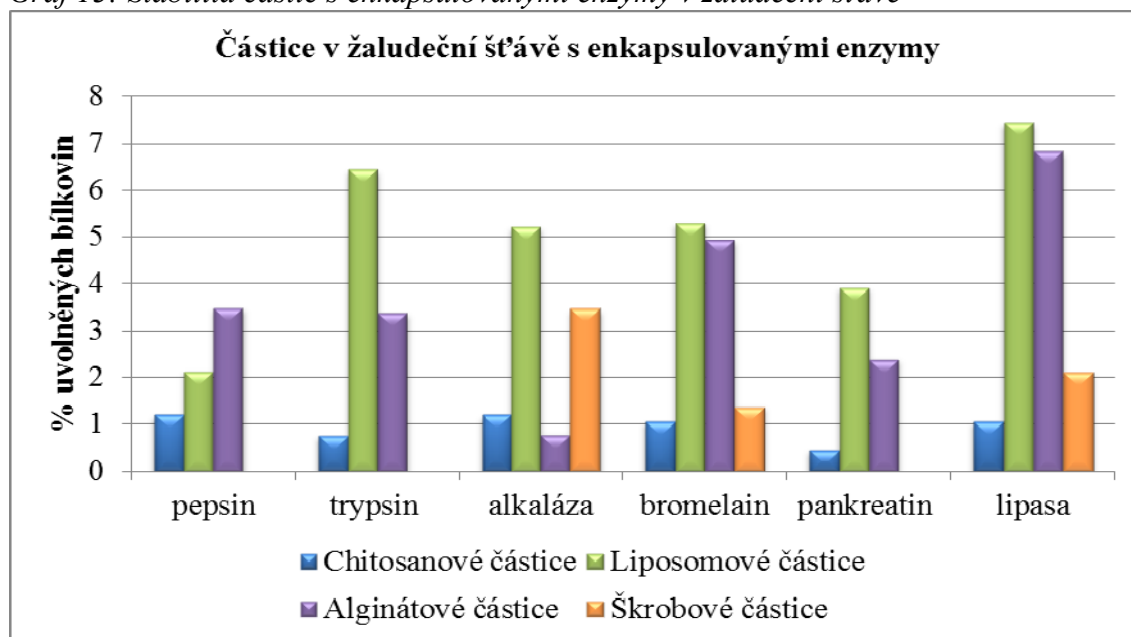
5.2.5 Stanovení stability částic v tělních tekutinách pomocí koncentrace bílkovin

Stabilita částic s enkapsulovanými enzymy byla sledována v modelové pankreatické, žaludeční a žlučové šťávě. Stabilita částic byla měřena pomocí stanovení koncentrace bílkovin a pomocí přístroje ZetaSizer Nano ZS, kterým se analyzoval zeta potenciál. Stanovení bylo provedeno u chitosanových, alginátových, škrobových a liposomových částic.

Postup stanovení stability částic pomocí určení koncentrace bílkovin bylo popsáno v kap. 4.7. Každý vzorek byl proměřen dvakrát a z těchto hodnot vypočítán průměr. Z koncentrace bílkovin před působením a po působení tělních tekutin bylo vypočítáno množství uvolněných bílkovin v %.

5.2.5.1 Stanovení stability částic v žaludeční šťávě

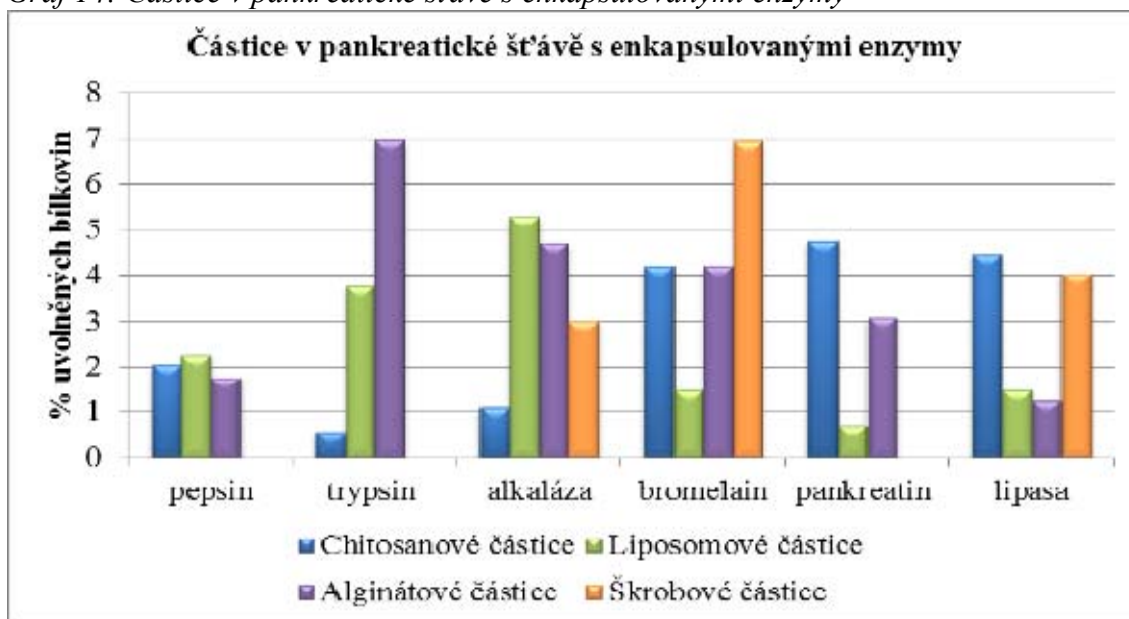
Graf 13: Stabilita částic s enkapsulovanými enzymy v žaludeční šťávě



V předchozím grafu (graf 13) bylo stanoveno procentuální uvolnění bílkovin z částic v žaludeční šťávě po 15 minutách. Množství uvolněných bílkovin se pohybovalo pod hranicí 8 %, což dokazuje dostatečnou stabilitu v agresivním prostředí žaludku. Procenta uvolněných bílkovin u jednotlivých částic byla velmi rozdílná. Nejvyšší procento uvolněných bílkovin bylo naměřeno u liposomových částic s enkapsulovanými enzymy, což potvrzuje obecně popisovanou nestabilitu liposomů v kyselém prostředí. Nejstabilnější částice, tedy s nejmenším % uvolněných bílkovin byly částice chitosanové s enkapsulovanými enzymy. Nejméně stabilní byly preparáty enkapsulovaného enzymu lipasy, kde množství uvolněných bílkovin bylo jak u liposomových, tak u alginátových částic více než 6,5 %.

5.2.5.2 Stanovení stability částic v modelové pankreatické šťávě

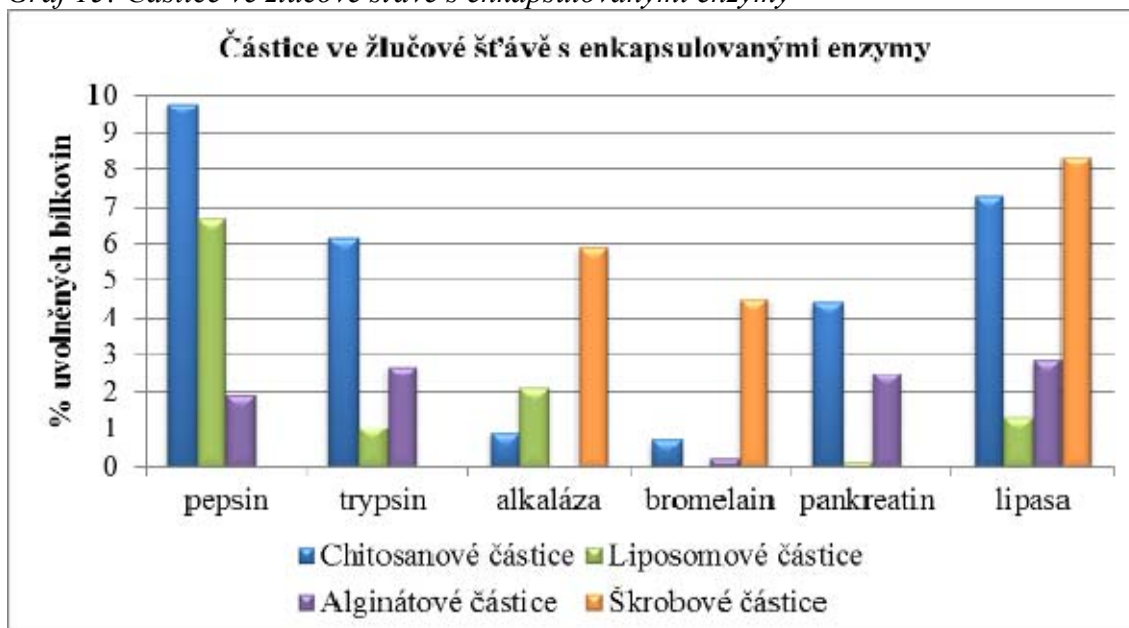
Graf 14: Částice v pankreatické šťávě s enkapsulovanými enzymy



Ve výše uvedeném grafu je znázorněno množství uvolněných bílkovin u jednotlivých typů částic s enkapsulovanými enzymy v %. Množství uvolněných bílkovin nepřesahovalo hranici 7 %. U alginátových částic s enkapsulovaným trypsinem a u škrobových částic s enkapsulovaným bromelainem bylo naměřeno nejvyšší množství uvolněných bílkovin. Důvodem u škrobových částic může být i působení glykosidázové (amylázové) složky pankreatické šťávy. Téměř u všech naměřených částic bylo množství uvolněných bílkovin pod hranicí 5 %.

5.2.5.3 Stanovení stability částic ve žlučové šťávě

Graf 15: Částice ve žlučové šťávě s enkapsulovanými enzymy



Ve výše uvedeném grafu je znázorněno procentuální uvolnění bílkovin po působení žlučové šťávy po dobu 30 minut. Množství uvolněných bílkovin se pohybovalo pod hranicí 6 % až na některé výjimky. Nejvyšší množství uvolněných bílkovin bylo zaznamenáno u chitosanových částic s enkapsulovaným pepsinem, u všech typů škrobových částic a u chitosanových částic s enkapsulovanou lipasou.

5.2.6 Stanovení stability částic v tělních tekutinách pomocí zeta potenciálu

Stanovení stability částic bylo analyzováno rovněž pomocí stanovení zeta potenciálu na přístroji ZetaSizer Nano ZS. Každý vzorek byl proměřen dvakrát a z těchto hodnot vypočítán průměr. Stanovení stability částic bylo proměřeno u chitosanových, alginátových, škrobových a liposomových částic. Výsledky jsou uvedeny v následujících tabulkách.

5.2.6.1 Stanovení stability u chitosanových částic

Stanovení stability částic pomocí zeta potenciálu potvrdilo výsledky předchozí metody stanovení stability částic pomocí množství uvolněných bílkovin. Ve všech třech typech modelových tělních tekutin nedochází k výraznému poklesu zeta potenciálu, tudíž částice jsou v těchto tekutinách relativně stabilní po daný časový úsek, který byl u žaludeční a pankreatické šťávy 15 minut a u žlučové šťávy 30 minut.

Tab. 6 Stabilita chitosanových částic v modelových tělních tekutinách – zeta potenciál

	pepsin	trypsin	alkaláza	lipasa	pankreatin	bromelain
ŽŠ (0 min)	38,6	51,0	53,3	54,7	41,1	44,1
ŽŠ (30 min)	43,1	39,7	45,4	49,4	43,7	44,3
PŠ (0 min)	19,2	35,8	34,9	34,5	32,6	31,5
PŠ (15 min)	30,9	37,7	33,6	33,5	31,4	31,1
ŽALŠ (0 min)	37,9	47,3	44,7	50,5	38,0	29,8
ŽALŠ (15 min)	34,2	24,9	44,4	42,0	38,6	35,9

5.2.6.2 Stanovení stability u alginátových částic

Stanovení stability částic pomocí naměření zeta potenciálu potvrdilo i v případě alginátových částic předchozí metodu stanovení stability částic pomocí množství uvolněných bílkovin. Ve žlučové šťávě docházelo k mírnému poklesu zeta potenciálu a tím i stability roztoku částic. Velmi výrazný pokles byl zaznamenán u žaludeční šťávy, kdy v čase nula došlo k poklesu zeta potenciálu. Po 15 minutách byl ovšem zeta potenciál už velmi podobný, jak zeta potenciál roztoku částic v čase nula v žaludeční šťávě.

Tab. 7 Stabilita alginátových částic v modelových tělních tekutinách v mV- zeta potenciál

	pepsin	trypsin	Alkaláz a	lipasa	pankreatin	bromelain
ŽŠ (0 min)	-25,5	-26,3	-23,5	-23,6	-22,3	-28,0
ŽŠ (30 min)	-24,8	-23,9	-24,3	-22,1	-21,4	-25,9
PŠ (0 min)	-21,3	-26,4	-20,0	-22,9	-26,0	-27,1
PŠ (15 min)	-29,1	-26,7	-19,7	-28,5	-28,0	-29,0
ŽALŠ (0 min)	-12,3	-13,9	-12,0	-15,1	-12,0	-19,8
ŽALŠ (15 min)	-13,2	-9,2	-11,1	-13,5	-14,4	-19,1

Pozn.: ŽALŠ – žaludeční šťáva, ŽŠ – žlučová šťáva, PŠ – pankreatická šťáva

5.2.6.3 Stanovení stability částic u liposomových částic

Stabilita liposomových částic byla ve žlučových šťávách velmi podobná jak v čase nula, tak po 30 minutách. V pankreatické šťávě byl zeta potenciál také velmi podobný. Největší rozdíl byl pozorován v žaludeční šťávě, kde po 15 minutách působení došlo k výraznému poklesu zeta potenciálu, což odpovídá nestabilitě liposomů v kyselém prostředí.

Tab. 8 Stabilita liposomových částic v modelových tělních tekutinách – zeta potenciál

	pepsin	trypsin	Alkaláz a	lipasa	pankreatin	bromelain
ŽŠ (0 min)	-43,9	-49,5	-44,5	-40,6	-44,6	-43,2
ŽŠ (30 min)	-54,2	-50,3	-48,7	-52,3	-48,9	-49,1
PŠ (0 min)	-47,2	-58,8	-41,0	-52,4	-59,2	-49,2
PŠ (15 min)	-59,7	-56,9	-55,3	-56,0	-57,6	-52,5
ŽALŠ (0 min)	-42,8	-42,1	-42,6	-35,1	-49,8	-46,3
ŽALŠ (15 min)	-30,4	-14,5	-34,8	-1,61	-27,2	-26,6

5.2.6.4 Stanovení stability u škrobových částic

Tab. 9 Stabilita škrobových částic v modelových tělních tekutinách – zeta potenciál

	Pepsin	trypsin	alkaláza
ŽŠ (0 min)	-22,1	-18,2	-15,6
ŽŠ (30 min)	-22,9	-16,9	-17,4
PŠ (0 min)	-15,1	-16,6	-14,0
PŠ (15 min)	-16,7	-16,3	-16,7
ŽALŠ (0 min)	0,0	0,8	2,7
ŽALŠ (15 min)	1,8	-1,2	1,3

Stabilita škrobových částic byla ve žlučové šťávě v čase nula a po 30 minutách velmi podobná. Obdobný případ byl pozorován i u pankreatické šťávy. Škrobové částice jsou nestabilní v žaludeční šťávě už v čase nula, zeta potenciál se pohyboval blízko 0 mV.

5.2.7 Stanovení stability částic s enkapsulovnými enzymy v simulovaných potravinách

5.2.7.1 Stabilita chitosanových částic v simulovaných potravinách

Stabilita chitosanových částic byla v modelových potravinách proměřena v čase nula (0 dní) a po 7 dnech (7 dní). Chitosanové částice byly ve vodě po 7 dnech stabilní. Ve 3% kyselině octové byl naměřen zeta potenciál vyšší než v čase nula, což znamená, že chitosanové částice jsou v nižším pH ještě stabilnější než při pH vyšším. V 10% ethanolu a v roztoku olej/voda byly chitosanové částice taktéž stabilní, a to bez ohledu na druh enkapsulovaného enzymu.

Tab. 10 Stabilita chitosanových částic v simulovaných potravinách – zeta potenciál

	Voda (0 dní)	Voda (7 dní)	Ocet (0 dní)	Ocet (7 dní)	Ethanol (0 dní)	Ethanol (7 dní)	Olej (0 dní)	Olej (7 dní)
Prázdné	33,1	31,0	43,2	55,0	47,8	56,9	52,2	46,7
Trypsin	32,9	28,5	53,6	52,3	54,7	54,6	41,9	41,3
Pepsin	34,3	32,2	42,6	40,7	43,5	41,5	39,4	33,4
Brom.	35,0	31,5	34,2	35,7	32,4	33,7	34,4	21,7
Pankr.	35,3	33,2	44,1	44,2	41,8	39,7	39,2	31,1
Lipasa	42,9	39,1	52,9	54,4	55,6	49,0	37,8	35,5
Alkaláza	32,3	30,4	53,0	55,5	50,6	52,9	40,9	40,6

Pozn.: Pankr. – Pankreatin, Brom. – Bromelain

5.2.7.2 Stabilita alginátových částic v simulovaných potravinách

Tab. 11 Stabilita alginátových částic v simulovaných potravinách – zeta potenciál

	Voda (0 dní)	Voda (7 dní)	Ocet (0 dní)	Ocet (7 dní)	Ethanol (0dní)	Ethanol (7 dní)	Olej (0 dní)	Olej (7 dní)
Prázdné	-14,6	-14,4	-11,3	-12,2	-10,3	-9,8	-13,6	-18,9
Trypsin	-18,2	-13,6	-19,6	-16,6	-22,4	-17,4	-26,6	-32,1
Pepsin	-24,3	-21,4	-20,0	-22,1	-26,3	-25,9	-24,1	-25,7
Brom.	-25,4	-24,9	-24,9	-22,7	-27,7	-21,4	-33,7	-23,9
Pankr.	-24,2	-23,5	-21,3	-17,2	-25,1	-23,7	-28,9	-20,5
Lipasa	-27,1	-23,5	-21,5	-20,8	-22,9	-14,9	-30,6	-36,8
Alkaláza	-31,6	-25,7	-18,0	-20,9	-17,5	-20,1	-34,5	-28,3

Alginátové částice vykazovaly mírnou nestabilitu ve vodě. Ve 3% kyselině octové byly zaznamenány mírné změny zeta potenciálu, z čehož můžeme odvodit, že alginátové částice mohou být v kyselém pH stabilní i po několika dnech. V 10% ethanolu v čase nula byly alginátové částice stabilní, po 7 dnech jejich stabilita u některých částic s enkapsulovanými enzymy klesala. V emulzi olej/voda byly alginátové částice v čase nula nejstabilnější ze všech 4 modelových potravin. Po 7 dnech v této emulzi u některých částic s enkapsulovanými enzymy stabilita částic klesala.

5.2.7.3 Stabilita liposomových částic v simulovaných potravinách

Tab. 12 Stabilita liposomových částic v simulovaných potravinách – zeta potenciál

	Voda (0 dní)	Voda (7 dní)	Ocet (0 dní)	Ocet (7 dní)	Ethanol (0dní)	Ethanol (7 dní)	Olej (0 dní)	Olej (7 dní)
Prázdné	-60,1	-57,7	-36,7	-34,6	-36,9	-30,8	-36,5	-31,1
Trypsin	-60,9	-58,6	-47,6	-45,8	-53,1	-55,5	-53,8	-57,7
Pepsin	-55,7	-53,9	-35,5	-33,8	-42,0	-41,4	-53,5	-58,1
Brom.	-56,0	-50,8	-33,5	-32,9	-41,3	-46,5	-48,1	-55,5
Pankr.	-58,2	-50,6	-37,7	-38,2	-44,7	-39,3	-48,7	-35,3
Lipasa	-61,0	-59,4	-34,9	-32,2	-40,0	-39,5	-51,9	-53,1
Alkaláza	-46,4	-44,6	-35,1	-30,6	-37,9	-41,0	-41,1	-44,3

Stabilita liposomových částic je velmi vysoká zejména ve vodě v čase nula. Po 7 dnech docházelo k mírnému vzrůstu zeta potenciálu, tedy i stability částic. Ve 3% kyselině octové byly částice na začátku relativně stabilní. Po 7 dnech docházelo k mírnému vzrůstu zeta potenciálu. V 10% ethanolu a emulzi olej/voda byly liposomové částice rovněž stabilní a po 7 dnech došlo k mírnému vzrůstu zeta potenciálu u některých částic s enkapsulovanými enzymy. Největší stabilita liposomových částic byla pozorována ve vodě a emulzi olej/voda.

5.2.7.4 Stabilita škrobových částic v simulovaných potravinách

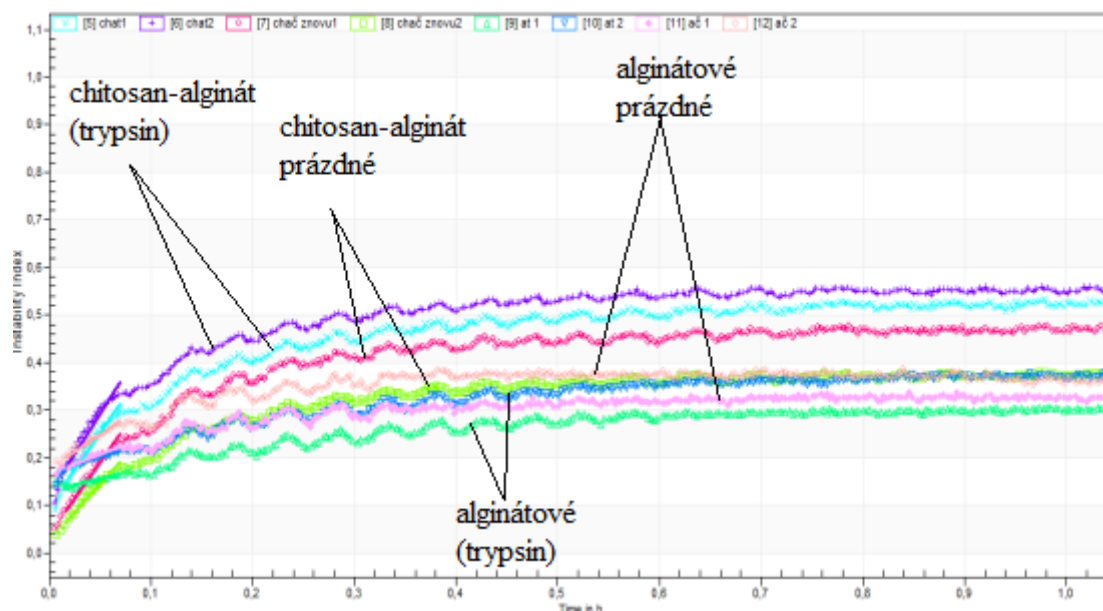
Tab. 13 Stabilita škrobových částic v simulovaných potravinách v mV

	Voda (0 dní)	Voda (7 dní)	Ocet (0 dní)	Ocet (7 dní)	Ethanol (0 dní)	Ethanol (7 dní)	Olej (0 dní)	Olej (7 dní)
Prázdné	-18,3	-16,8	-35,1	-34,0	-41,6	-36,0	-45,7	-32,2
Trypsin	-22,9	-22,4	-31,3	-23,6	-36,2	-30,6	-45,1	-38,0
Pepsin	-18,3	-17,9	-27,0	-21,2	-31,0	-25,0	-43,3	-39,0
Brom.	-15,7	-15,6	-19,2	-11,2	-26,0	-11,2	-35,9	-35,3

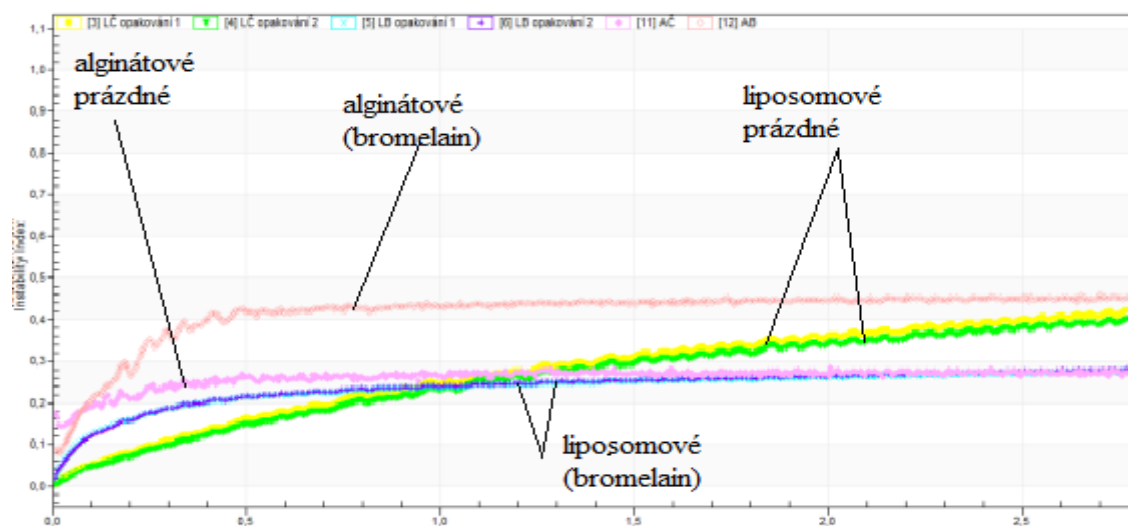
Stabilita škrobových částic byla ve vodném prostředí podobná jak v čase nula, tak po 7 dnech. Ve 3% kyselině octové byla stabilita u většiny enkapsulovaných enzymů větší než ve vodném prostředí, a to i po 7 dnech působení. V 10% ethanolu a v emulzi olej/voda byly částice taktéž stabilnější než ve vodném prostředí i po 7 dnech inkubace.

5.2.8 Stanovení vlastností částic pomocí analytické centrifugace

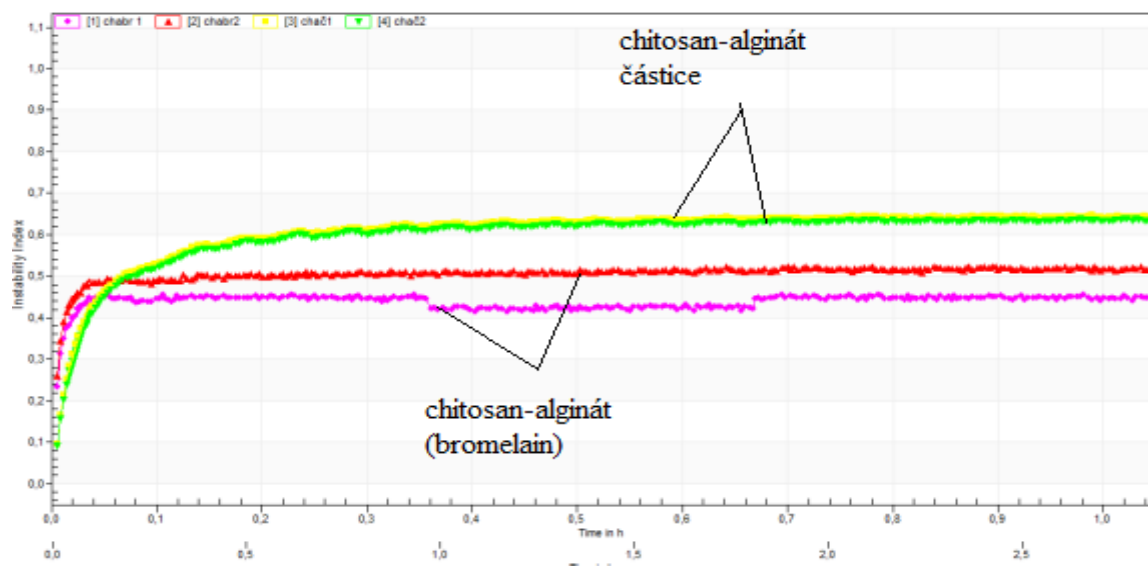
Stanovení vlastností částic s enkapsulovanými enzymy pomocí analytické centrifugace bylo provedeno podle postupu uvedeného v metodické kapitole (viz kap. 4.9). Stanovení bylo provedeno u chitosanových, chitosan-alginátových, liposomových, alginátových a škrobových částic jak bez enkapsulovaného enzymu, tak s enkapsulovaným enzymem. Obrázky 28-30 ukazují křivky indexu nestability jednotlivých vzorků – čím je index nestability větší, tím je systém méně stabilní a rychleji dochází k usazování částic. Jako nejméně stabilní částice byly stanoveny prázdné chitosan-alginátové částice.



Obr. 28 Porovnání indexu nestability jednotlivých systémů



Obr. 29 Porovnání indexu nestability jednotlivých systémů



Obr. 30 Porovnání indexu nestability jednotlivých systémů

Tab. 14 Porovnání indexu nestability jednotlivých systémů

Sample Name	Start in h	End in h	Mean RCF in g	Slope in 1/h	StdDev in 1/h
[05] chat1	0,02	0,07	297	3,1122	0,1245
[06] chat2	0,02	0,07	297	3,3695	0,1324
[07] chač znovu1	0,02	0,07	297	3,0423	0,1010
[08] chač znovu2	0,02	0,07	297	2,3958	0,0865
[09] at 1	0,02	0,07	297	0,4992	0,0274
[10] at 2	0,02	0,07	297	0,6577	0,0324
[11] ač 1	0,02	0,07	297	0,8124	0,0646
[12] ač 2	0,02	0,07	297	1,3886	0,0522

Pozn. chat1, chat2 – chitosan-alginátové částice s trypsinem, chač znovu1, chač znovu2 – chitosan-alginátové částice bez enzymu, at1, at2 – alginátové částice s trypsinem, ač1, ač2 – alginátové částice bez enzymu

Tab. 15 Porovnání indexu nestability jednotlivých systémů

Sample Name	Start in h	End in h	Mean RCF in g	Slope in 1/h	StdDev in 1/h
[03] LČ opakování 1	0,03	0,08	298	0,5062	0,0069
[04] LČ opakování 2	0,03	0,08	298	0,4876	0,0100
[05] LB opakování 1	0,03	0,08	298	1,0540	0,0255
[06] LB opakování 2	0,03	0,08	298	1,0582	0,0223
[11] AČ	0,03	0,08	298	0,7677	0,0685
[12] AB	0,03	0,08	298	1,8742	0,0557

Pozn. LČ opakování 1, LČ opakování 2 – liposomové částice bez enzymu, L opakování 1, LB opakování 2 – liposomové částice s bromelainem, AČ- alginátové částice bez enzymu, AB – alginátové částice s bromelainem

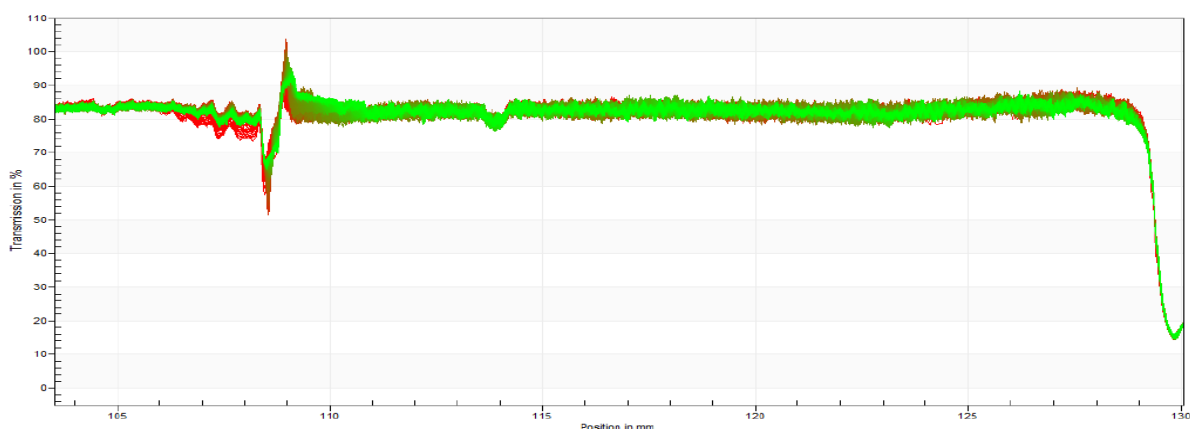
Tab. 16 Porovnání indexu nestability jednotlivých systémů

Sample Name	Start in h	End in h	Mean RCF in g	Slope in 1/h	StdDev in 1/h
[01] chabr1	0,01	0,04	297	3,5584	0,2529
[02] chabr2	0,01	0,04	297	3,3949	0,2732
[03] chač1	0,01	0,04	297	8,1055	0,4787
[04] chač2	0,01	0,04	297	8,0331	0,3821

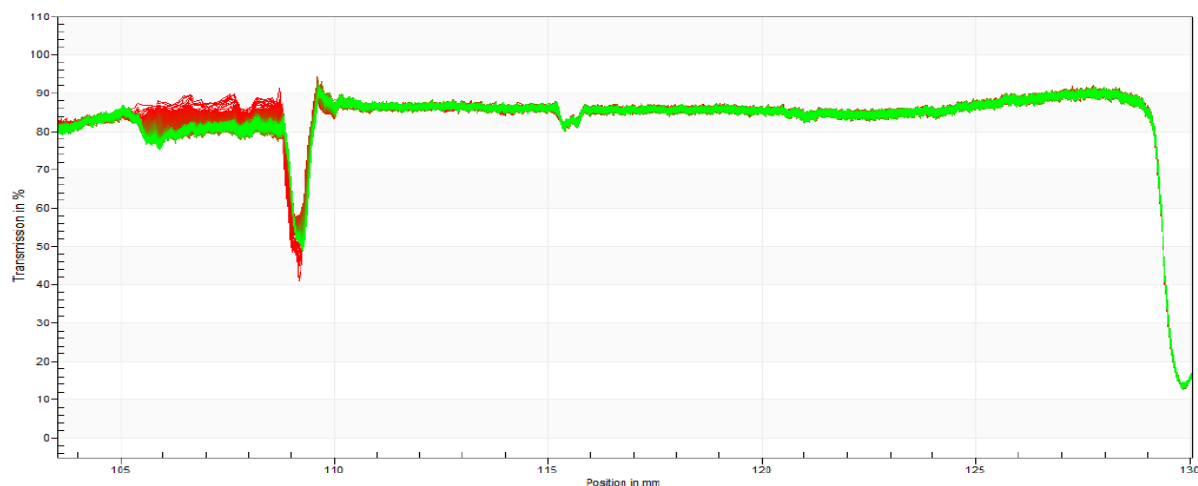
Pozn. chabr1, chabr2 – chitosan-alginátové částice s bromelainem, chač1, chač2 – chitosan-alginátové částice bez enzymu

Tabulky 14-16 porovnávají nestabilitu jednotlivých vzorků. Sloupec „Slope in 1/h“ udává směrnici křivky ve výše uvedených grafech v prvních fázích centrifugace. Čím je hodnota vyšší, tím je systém méně stabilní. Nejvyšší hodnota směrnice byla dosažena u prázdných chitosan-alginátových částic. Tyto částice jsou tedy nejméně stabilní z testovaných částic a nejrychleji u nich dochází k sedimentaci. U škrobových a chitosanových částic nedocházelo k viditelnému usazování vzorků. Vzorky byly velmi čiré již na počátku centrifugace, nedocházelo tedy ke změně transmitance vlivem odstředivého pole, a proto nemohly být tyto vzorky hodnoceny pomocí indexu nestability.

5.2.8.1 Stanovení vlastností u chitosanových částic



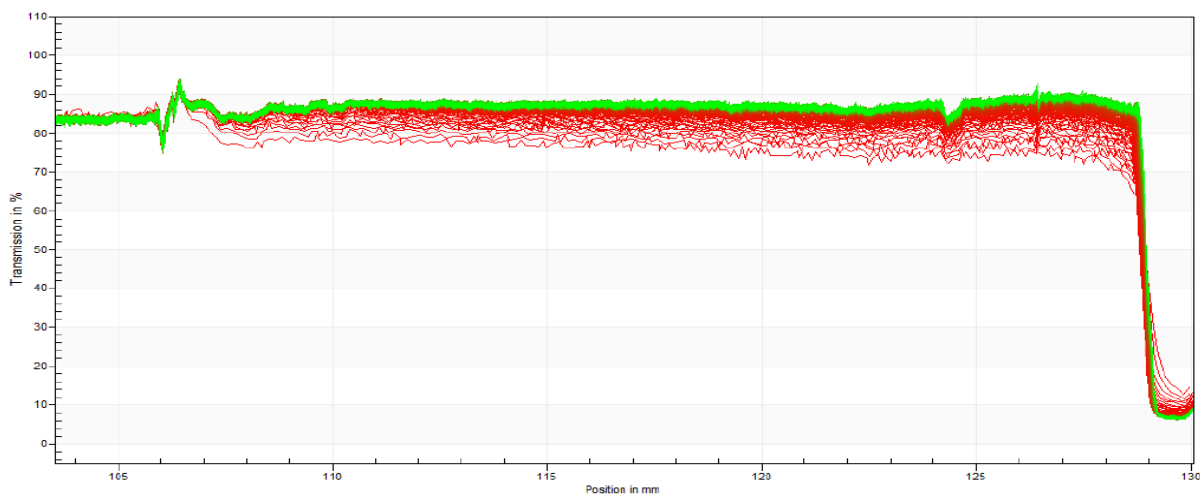
Obr. 31 Chitosanové částice



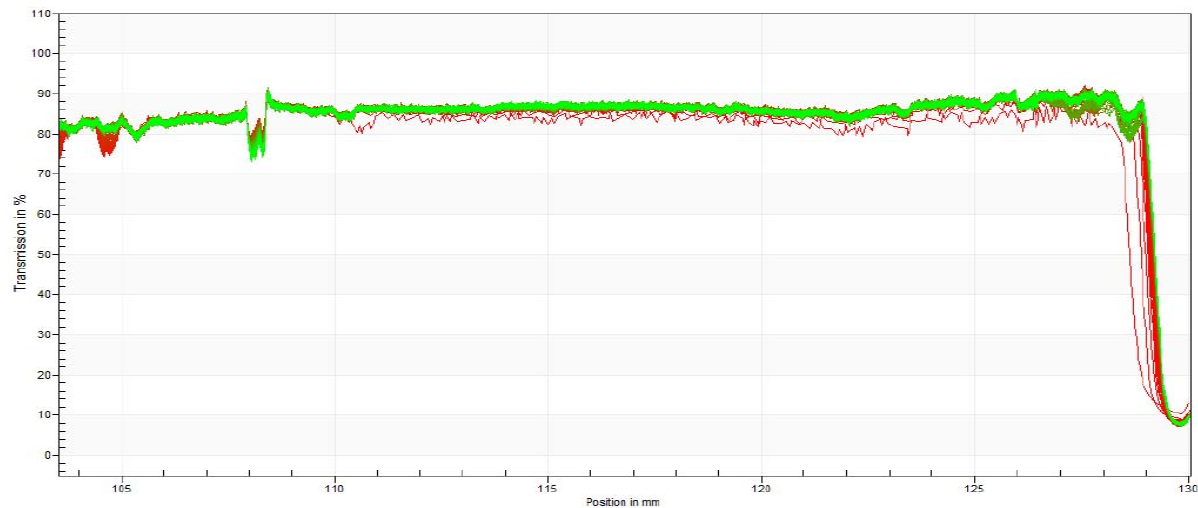
Obr. 32 Chitosanové částice s enkapsulovaným bromelainem

V grafech je zobrazena na ose y transmitance, na ose x pak pozice v kyvetě (nejvíce vpravo je dno kyvety). Vzorke chitosanových částic byly velmi čiré, nelze u nich pozorovat žádnou sedimentaci.

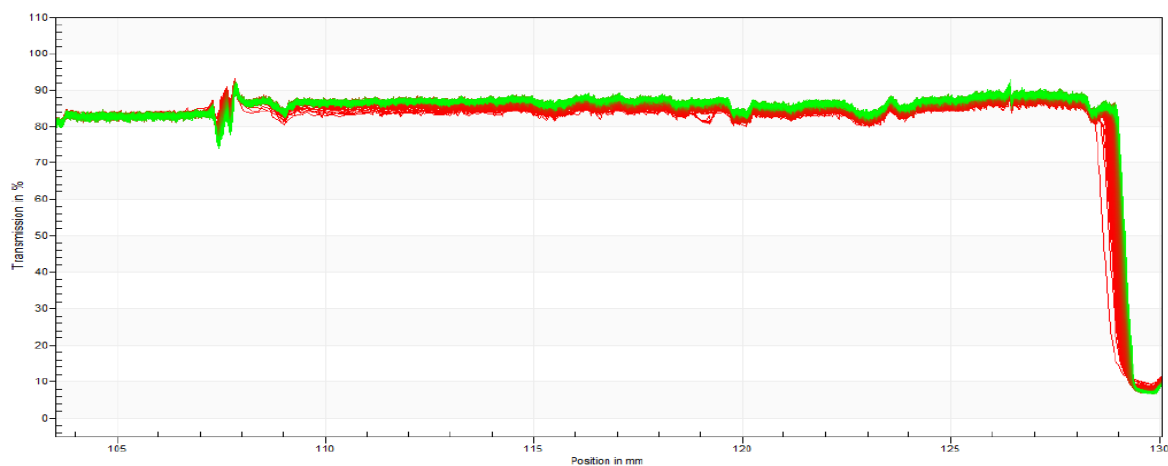
5.2.8.2 Stanovení vlastností u chitosan-alginátových částic



Obr. 33 Chitosan-alginátové částice



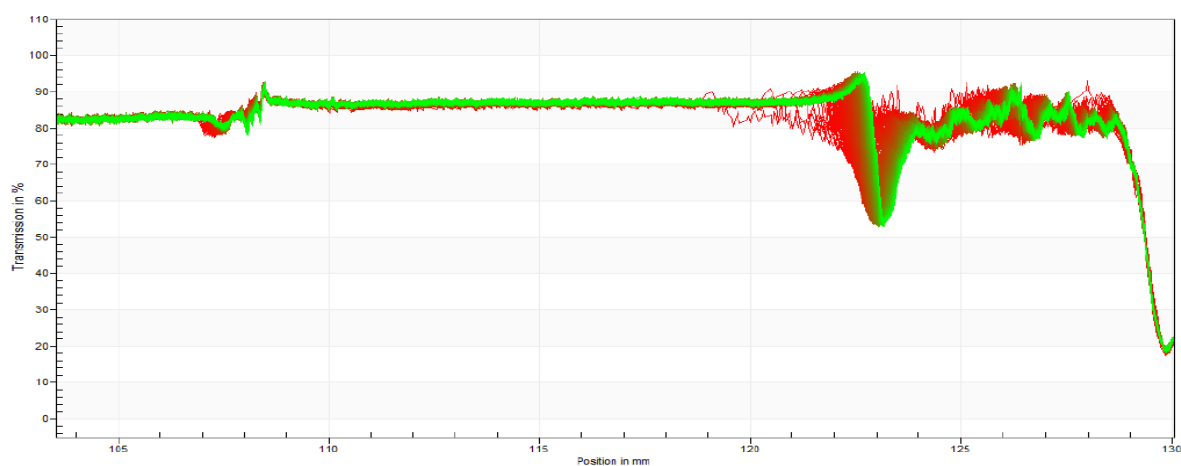
Obr. 34 Chitosan-alginátové částice s enkapsulovaným bromelainem



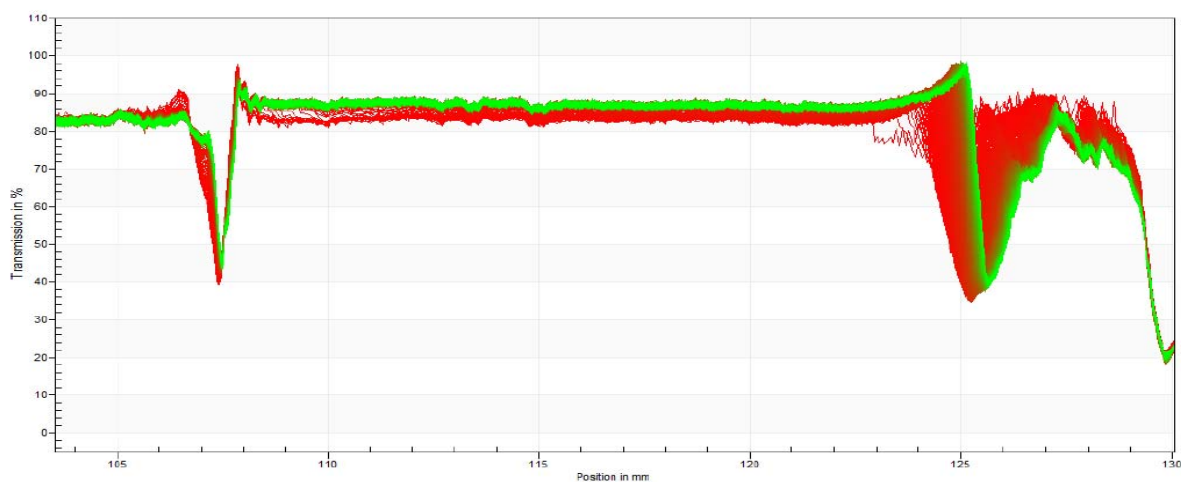
Obr. 35 Chitosan-alginátové částice s enkapsulovaným trypsinem

U chitosan-alginátových částic dochází k homogenní sedimentaci částic. U dna dochází ke vzniku sedimentu, který je částečně i stlačován. U prázdných částic dochází k výraznější sedimentaci než u vzorků s enkapsulovaným enzymem, kde je sedimentace minimální.

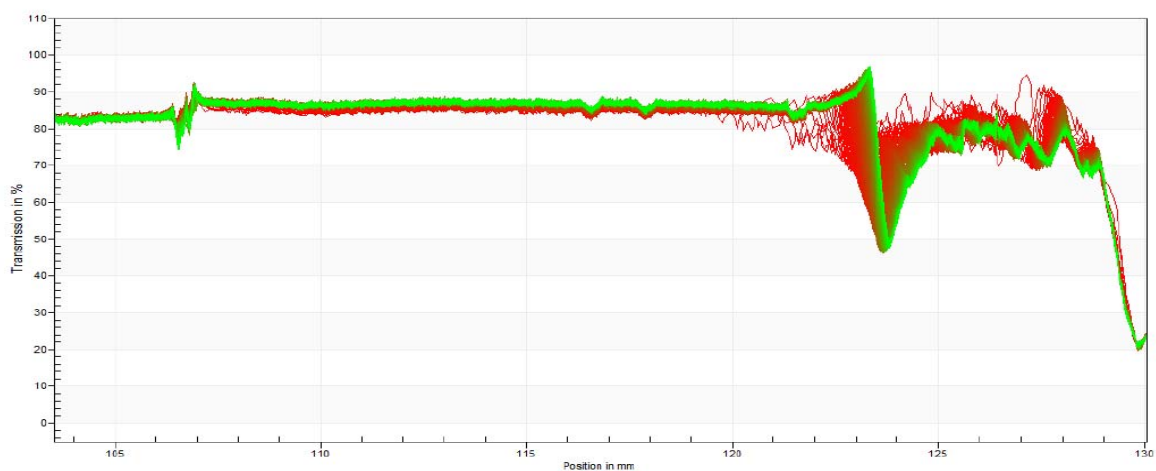
5.2.8.3 Stanovení vlastností u alginátových částic



Obr. 36 Alginátové částice



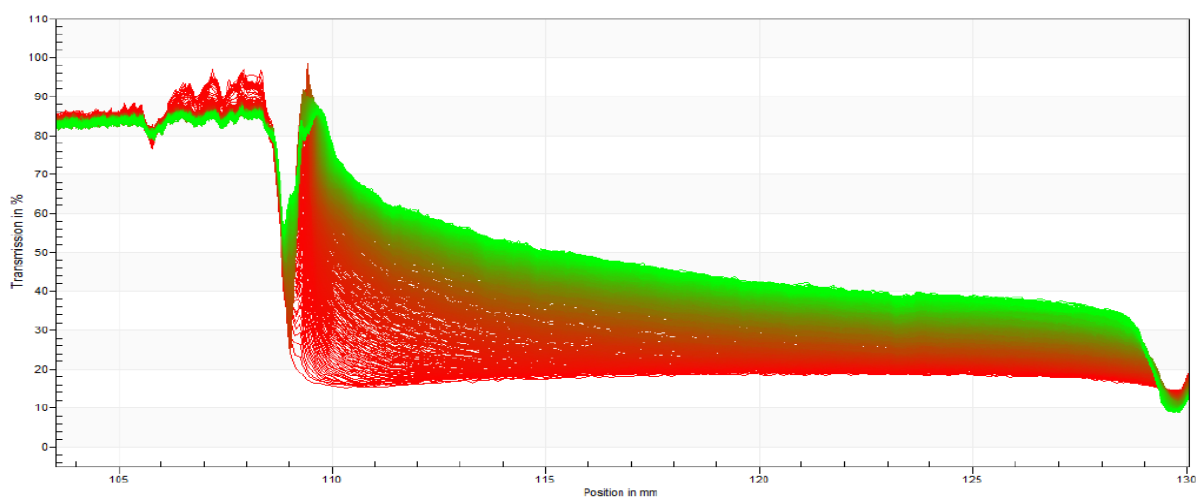
Obr. 37 Alginátové částice s enkapsulovaným bromelainem



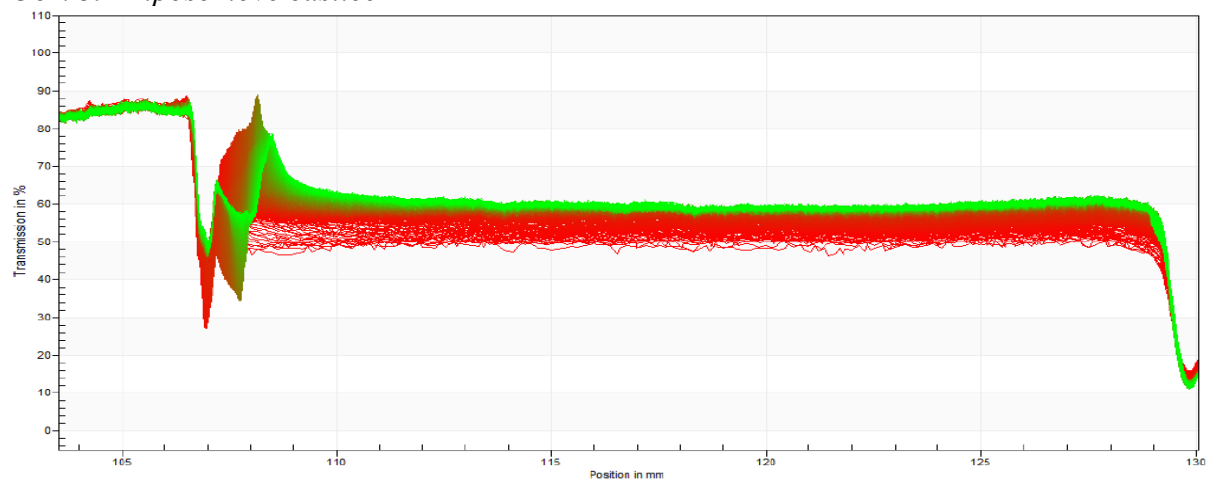
Obr. 38 Alginátové částice s enkapsulovaným trypsinem

U alginátových částic dochází zpočátku k homogennímu usazování části s pozvolným náznakem zónové sedimentace. Postupně pravděpodobně dochází k tvorbě agregátů a jejich hromadnému usazování.

5.2.8.4 Stanovení vlastností u liposomových částic



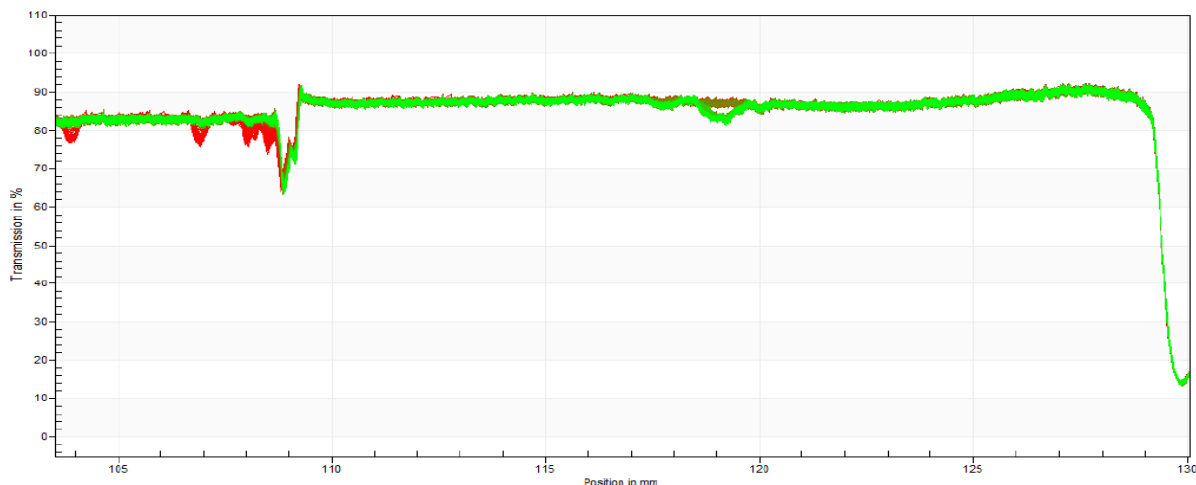
Obr. 39 Liposomové částice



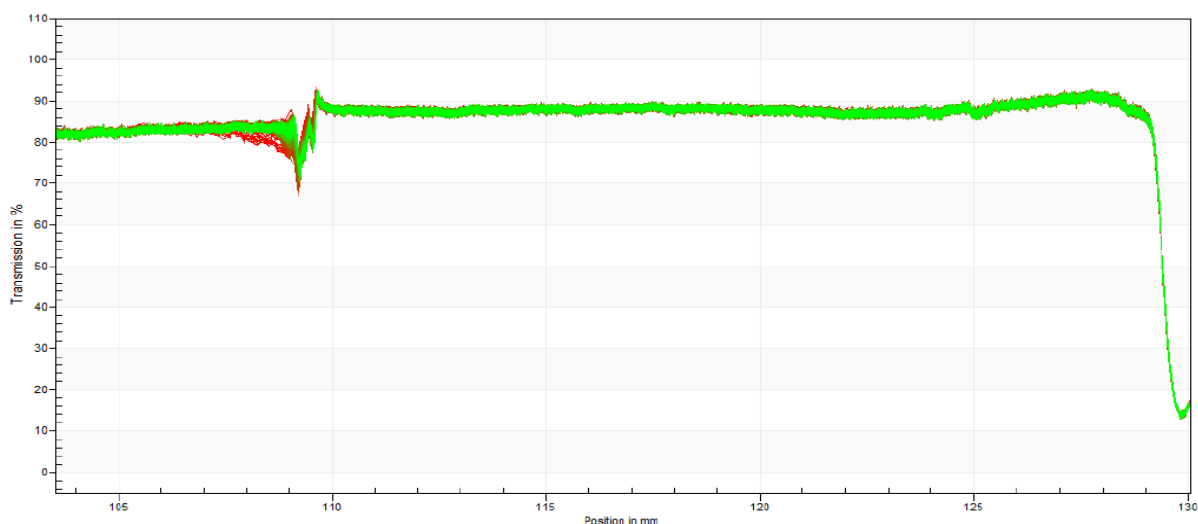
Obr. 40 Liposomové částice s enkapsulovaným bromelainem

U prázdných liposomů docházelo k homogenní sedimentaci a tvorbě sedimentu na dně kyvety. U liposomů s enkapsulovaným enzymem docházelo spíše k vzlínání a méně k sedimentaci vzorku.

5.2.8.5 Stanovení vlastností u škrobových částic



Obr. 41 Škrobové částice




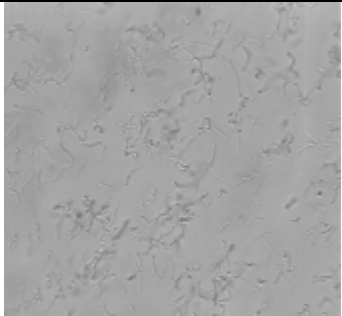

Obr. 42 Škrobové částice s enkapsulovaným bromelinem

Vzorky škrobových částic byly už na počátku centrifugace velmi čiré, tudíž samotnou sedimentaci nelze pozorovat.






5.3 Enkapsulace mikroorganismů

Jako modelové mikroorganismy pro enkapsulace byly zvoleny probiotické kmeny *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve*. Byly připraveny alginátové, chitosanové, chitosan-alginátové, alginát-agarové, alginát-agarosové, alginát-škrobové a alginát-pullulanové. (viz. kap. 4.3.2). Vzniklé částice měly nejčastěji velikost o průměru od 0,5 mm do 3 mm. Velikost připravených částic byla zásadně ovlivněna způsobem přípravy, který vyžadoval sterilní přidávky složek enkapsulační směsi, což nebylo technicky možné jinak než sterilní pipetou. Rozprašovací zařízení se sterilní tryskou nebylo v době řešení práce

k dispozici. Mikroorganismy byly kultivovány v komerčním MRS médiu, při teplotě 37°C. Po 48 hodinách byly buňky zcentrigovány (6000 ot/min) a použity k enkapsulaci.

		
Kultivace kultury <i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (640x)	<i>Bidobacterium breve</i> (640x)

Obr. 43 Mikroorganismy v médiu a pod optickým mikroskopem





























	
Alginátové částice	Chitosan-alginátové částice
	
Chitosanové částice	Alginát-agarosové částice
	
Alginát-agarové částice	

Obr. 44 Různé typy připravených částic

Na obrázcích výše jsou příklady připravených částic bez enkapsulovaných mikroorganismů (na skličku vpravo) a s enkapsulovanými mikroorganismy (na skličku vlevo). Po přípravě všech typů částic s enkapsulovanými mikroorganismy došlo ke změně barvy a mírně změně velikosti částic. Pevnost byla podobná jako u částic bez enkapsulovaných mikroorganismů. Alginátové, chitosan-alginátové, alginát-agarové, alginát-agarosové, alginát-škrobové a alginát-pullulanové částice byly zakalené a chitosanové částice měly bílé zbarvení.

5.3.1 Stanovení stability částic v tělních tekutinách

Tab. 17 Částice před působením a po působení tělních tekutin
















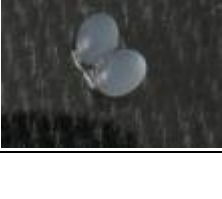


Částice	Před působením šťáv	Žaludeční šťáva	Pankreatická šťáva	Žlučová šťáva
Alginát 5 mm				
Chitosan				
Chitosan-alginát				
Alginát-agar				
Alginát-agarosa				
Alginát-škrob				
Alginát-pullulan				

























Při stanovení stability částic v tělních tekutinách byly připraveny alginátové, chitosanové, chitosan-alginátové, alginát-agarové, alginát agarosové, alginát škrobové a alginát-pullulanové částice. Tyto částice byly ponechány 15 minut v žaludeční a pankreatické šťávě a 30 minut ve žlučové šťávě.

Alginátové a chitosan-alginátové částice byly stabilní ve všech třech typech tělních tekutin a nedocházelo k žádnému rozpadání částic. Po působení žaludeční šťávy na chitosanové částice došlo k narušení struktury a viditelnému nabobtnání částic. Chitosanové částice se po působení žlučové šťávy rozpadaly. Po působení šťáv na alginát-agarové částice došlo k mírnému zmenšení částic a tím i k malému rozpadu. U alginát-škrobových částic došlo ke znatelnému rozpadu částic po působení pankreatické šťávy. U žaludeční šťávy nebyla pozorována žádná změna, ale po působení žlučové šťávy na alginát-škrobové částice došlo k narušení struktury a bobtnání částic. Alginát-pullulanové částice byly stabilní v pankreatické šťávě, k narušení struktury došlo po působení žlučové šťávy podobně jako u alginát-škrobových částic. Mírné narušení struktury alginát-pullulanových částic nastalo i po působení žaludeční šťávy.

5.3.2 Stanovení stability částic v modelových potravinách

Tab. 18 Připravené typy částic v modelových podmínkách

Čas/teplota	částice	Ocet	Ethanol	Olej/voda
1 týden při teplotě 5°C 5 mm	Alginát			
1 měsíc při teplotě 5°C				
1 týden při teplotě 5°C	Chitosan			
1 měsíc při teplotě 5°C				
1 týden při teplotě 5°C	Chitosan-alginát			
1 měsíc při teplotě 5°C				























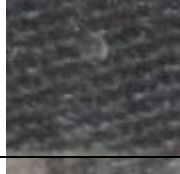





1 týden při teplotě 5°C — 5 mm	Alginát- agar			
1 měsíc při teplotě 5°C				
1 týden při teplotě 5°C	Alginát- agarosa			
1 měsíc při teplotě 5°C				
1 týden při teplotě 5°C	Alginát- škrob			
1 měsíc při teplotě 5°C				
1 týden při teplotě 5°C	Alginát- pullulan			
1 měsíc při teplotě 5°C				

Stabilita v modelových potravinách byla sledována u alginátových, chitosanových, chitosan-alginátových, alginát-agarových, alginát-agarosových, alginát-škrobových a alginát-pullulanových částic, které byly ponechány v modelových podmínkách. Stabilita částic byla pozorována po jednom týdnu a po jednom měsíci inkubace v daných podmínkách. Většina typů částic byla stabilní a nebyly zaznamenány známky rozpadu či změny velikosti nebo bobtnání. Částice stabilní ve všech třech typech modelových potravinách byly alginátové, chitosan-alginátové, alginát-agarové a alginát-agarosové. U alginát-škrobových a alginát-pullulanových částic byl zaznamenán mírný zákal ve 3% kyselině octové. Nejméně stabilní

byly překvapivě chitosanové částice ve 3% kyselině octové, kde byl zaznamenán mírný rozpad po měsíci působení.

5.3.3 Stanovení stability částic v kultivačním médiu

Tab. 19 Připravené částice po stanovených intervalech inkubace v médiu

Částice	Den 1	Den 2	Den 3	Den 7
Alginát — 5 mm				
Chitosan				
Chitosan-alginát				
Alginát-agar				
Alginát-agarosa				
Alginát-škrob				
Alginát-pullulan				

Pro stanovení stability částic v kultivačním médiu byly připraveny alginátové, chitosanové, chitosan-alginátové, alginát-agarové, alginát-agarosové, alginát-škrobové a alginát-pullulanové částice. Tyto částice byly pozorovány po určitých intervalech inkubace v kultivačním médiu. Účelem experimentu bylo ověřit, zda složky kultivačního média bakterií mohou ovlivnit stabilitu částic.

Po prvním dni působení byl pozorován rozpad částic u alginát-škrobových a u alginát-pullulanových částic. Po druhém dni inkubace částic v kultivačním médiu docházelo k dalšímu rozpadu alginát-škrobových a alginát-pullulanových částic, přičemž alginát-

škrobové částice byly nejvíce rozrušené. Dále docházelo ke změně pevnosti u alginát-agarových a u alginát-agarosových částic. Alginátové a chitosan-alginátové částice byly bez známek rozpadu. U chitosanových částic byla pozorována změna zbarvení možným nárůstem koncentrace buněk uvnitř částice.

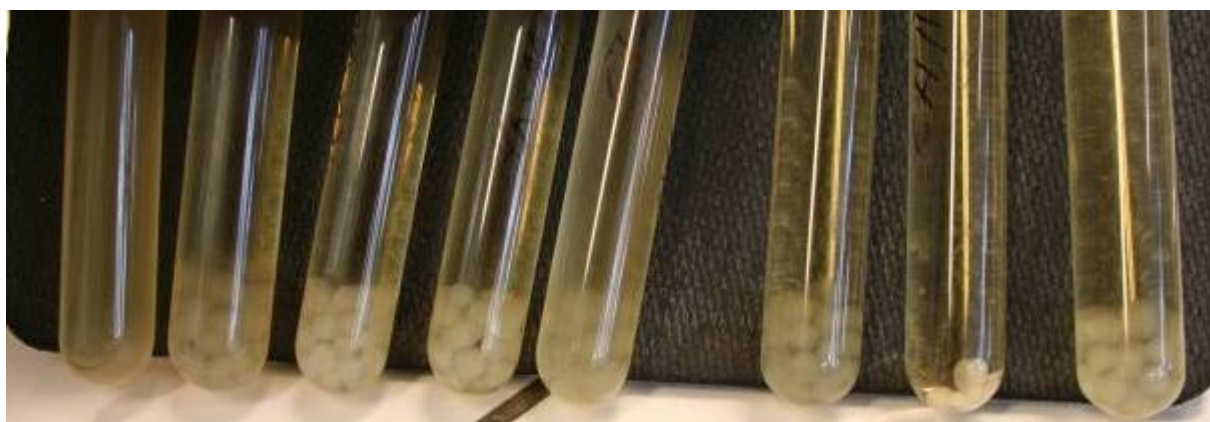
Po třetím dni byly alginát-škrobové částice téměř zcela rozrušeny a obsah částic byl přítomen v médiu. U alginát-pullulanových částic byl pozorován další rozpad částic, změna velikosti, pevnosti a tvaru. U alginát-agarových a alginát-agarosových byla pozorována změna pevnosti částic oproti druhému dni, byl pozorován mírný rozklad částic. U alginátových a chitosan-alginátových částic byl až po třetím dnu inkubace poprvé pozorován mírný rozpad a změna pevnosti částic. Chitosanové částice byly opět tmavší.

Po sedmém dni inkubace alginát-škrobové částice vytvořily na dně zkumavky viskózní usazeninu. Podobný jev byl pozorován i u alginát-pullulanových částic. Alginát-agarové a alginát-agarosové částice se chovaly velmi obdobně a vykazovaly značný rozpad částic a téměř žádnou pevnost, měly tendenci se rozpadat po jakékoliv manipulaci. Alginátové a chitosan-alginátové vykazovaly mírný rozpad částic. Tyto dva typy částic byly v médiu nejstabilnější. Chitosanové částice byly po sedmi dnech opět tmavší, pravděpodobně vlivem růstu buněk uvnitř částic, protože u těchto typů částic nebyl pozorován žádný rozpad ani změna pevnosti či velikosti.



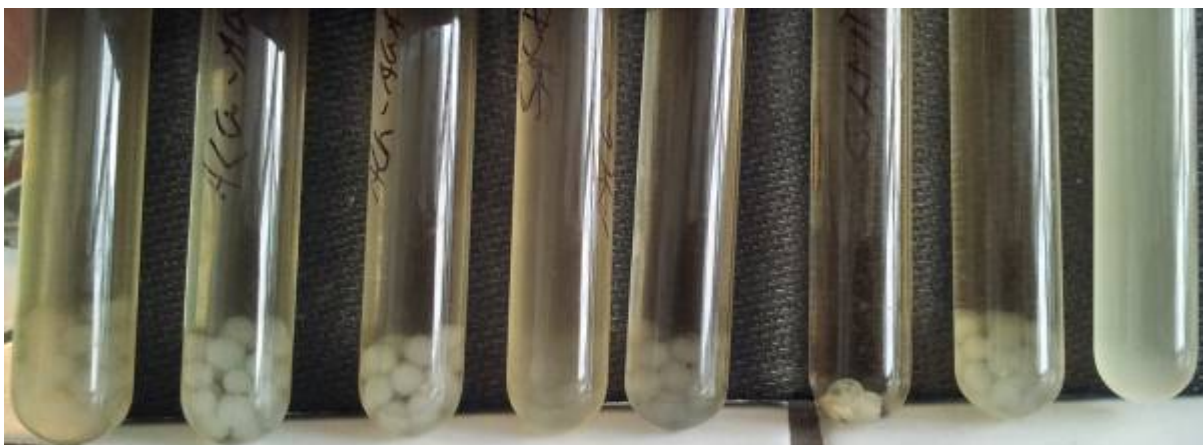
Obr. 45 Částice v médiu po prvním dni

Zleva: 1. Kultura, 2. Alginát-pullulanové, 3. Alginát-agarové, 4. Alginát-agarosové, 5. Alginát-škrobové, 6. Chitosan-alginátové, 7. Chitosanové, 8. alginátové



Obr. 46 Částice v médiu po druhém dni

Zleva: 1. Kultura, 2. Alginát-pullulanové, 3. Alginát-agarové, 4. Alginát-agarosové, 5. Alginát-škrobové, 6. Chitosan-alginátové, 7. Chitosanové, 8. Alginátové



Obr. 47 Částice v médiu po třetím dni

Zleva: 1. Alginát-pullulanové, 2. Alginát-agarové, 3. Alginát-agarosové, 4. Alginát-škrobové, 5. Chitosan-alginátové, 6. Chitosanové, 7. Alginátové, 8. kultura



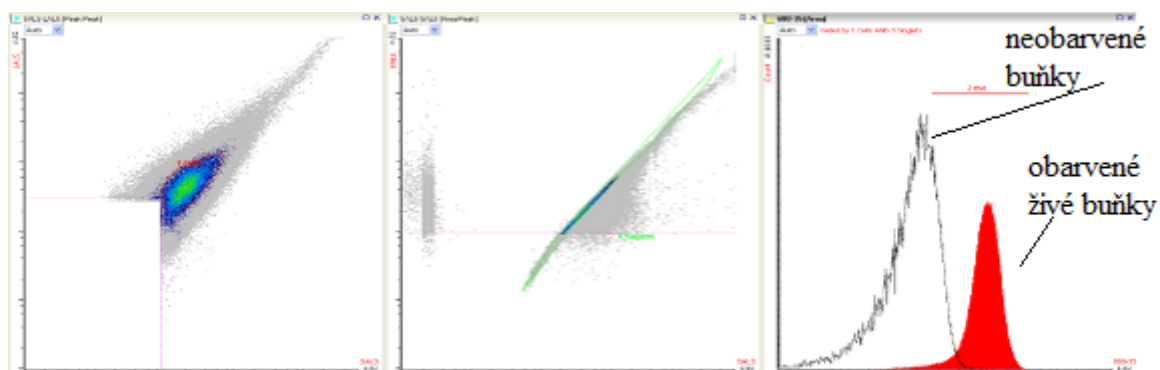
Obr. 48 Částice v médiu po sedmém dni

Zleva: 1. Kultura, 2. Alginát-pullulanové, 3. Alginát-agarové, 4. Alginát-agarosové, 5. Alginát-škrobové, 6. Chitosan-alginátové, 7. Chitosanové, 8. Alginátové

Stabilita částic mohla být pozorována i podle zakalení média. Po prvním dni bylo pozorováno mírné zakalení pouze u alginát-škrobových částic. Po druhém dni bylo pozorováno výraznější zakalení média u alginát-škrobových částic a mírné zakalení u alginát-pullulanových částic. Velmi malý zákal se objevil u alginát-agarových a alginát-agarosových částic. Čirý roztok byl u chitosanových, chitosan-alginátových a alginátových částic. Po třetím dni byl patrný velmi výrazný zákal jak u alginát-škrobových částic, tak u alginát-pullulanových částic. Zákal byl větší i u alginát-agarových a alginát-agarosových částic. Po sedmém dni byl pozorován zákal u všech typů částic kromě částic chitosanových. Tyto částice se po celou dobu nerozpadaly, ale byla sledována jejich barevná změna, kterou pravděpodobně zapříčinil růst mikroorganismů uvnitř částice.

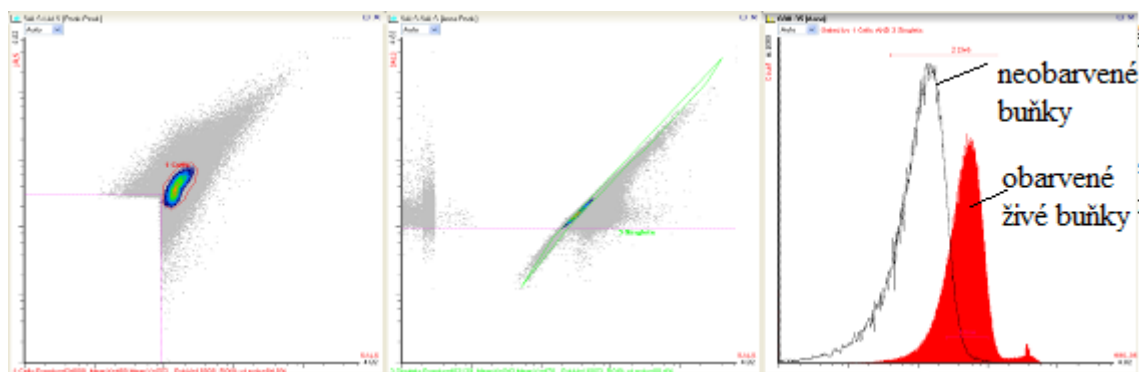
5.3.4 Stanovení viability buněk pomocí průtokové cytometrie

Ke stanovení viability buněk bylo využito barvení propidiumjodidem, který slouží k obarvení mrtvých buněk. 1 ml kultury byl centrifugován při 6 000 otáčkách, rozsuspendován v destilované vodě, obarven a poté stanovena viabilita pomocí průtokové cytometrie. Barvivo propidiumjodid se váže na DNA.



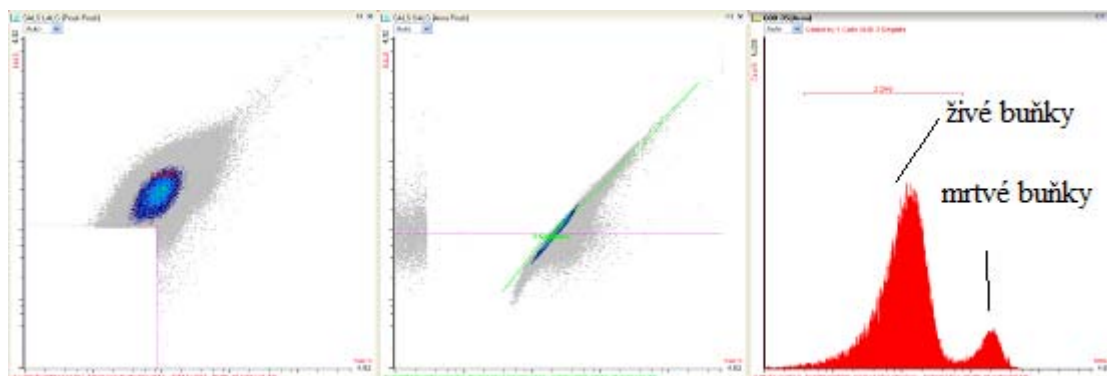
Obr.49 Viabilita buněk *Bifidobacterium breve* po 48 hodinové kultivaci

Během 48 hodin se nevyskytovaly v médiu žádné mrtvé buňky mikroorganismů.



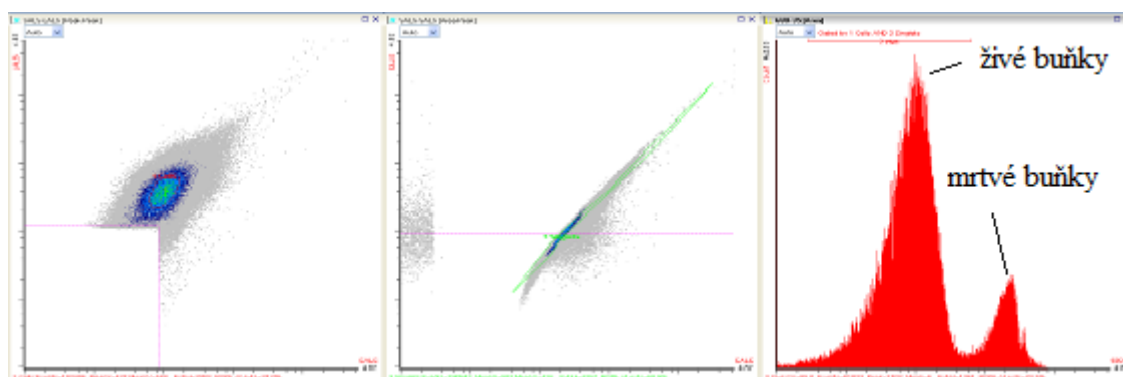
Obr. 50 Viabilita buněk *Bifidobacterium breve* po 3 dnech kultivace

Po 72 hodinách kultivace bylo v médiu již 10 % buněk mrtvých (obr.50). Kultivace bakterií po dobu 48 hodin tedy poskytovala nejvyšší koncentraci buněk na ml, současně byly buňky nejvíce vitální, proto byla tato kultura používána i k enkapsulaci.



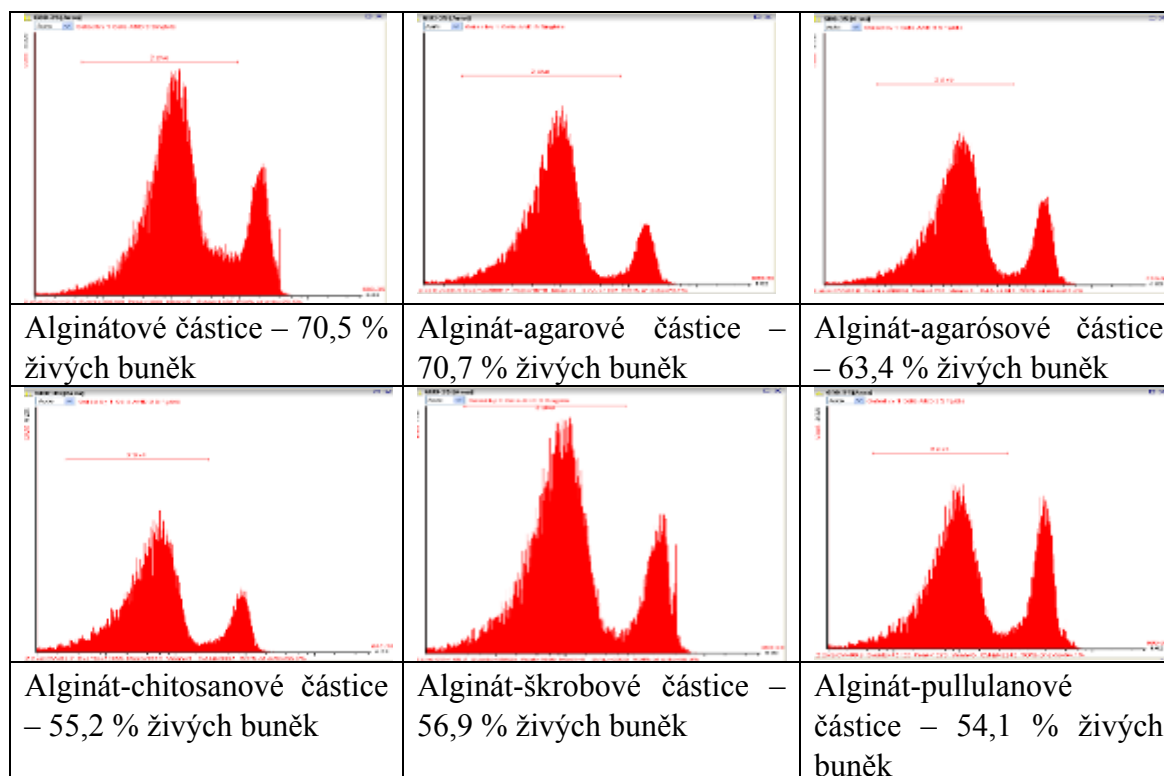
Obr. 51 Viabilita buněk *Bifidobacterium breve* po 7 dnech kultivace

Po 7 dnech kultivace bylo v médiu přibližně 20% mrtvých buněk (obr.51), po 10 dnech kultivace bylo v médiu již 30% mrtvých buněk (obr.52).



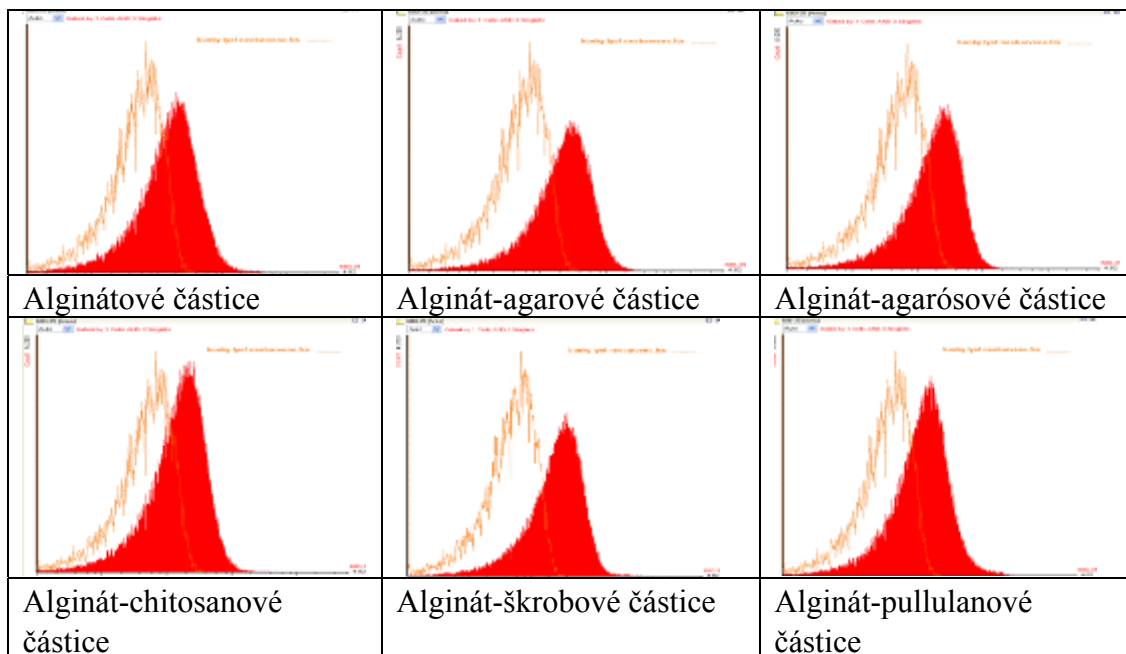
Obr.52 Viabilita buněk *Bifidobacterium breve* po 10 dnech kultivace

Viabilita buněk byla sledována i při inkubaci enkapsulovaných buněk v médiu. Postupně docházelo k uvolňování buněk z připravených částic a viabilita těchto buněk byla sledována pomocí průtokové cytometrie. Viabilita enkapsulovaných buněk byla velmi podobná viabilitě buněk bez enkapsulace. Po deseti dnech obsahovala kultura neenkapsulovaných buněk 73,5 % živých buněk. Jednotlivé preparáty uvolňovaly postupně buňky do média a desátý den kultivace obsahovalo kultivační médium od 50 % do 70 % živých buněk. U chitosanových preparátu nedošlo k uvolnění buněk do média ani po deseti dnech.



Obr. 53 Porovnání viability buněk *Bifidobacterium breve* uvolněných do média z enkapsulovaných preparátů během kultivace - 10.den kultivace (první pík představuje množství živých buněk, druhý pík představuje množství mrtvých buněk)

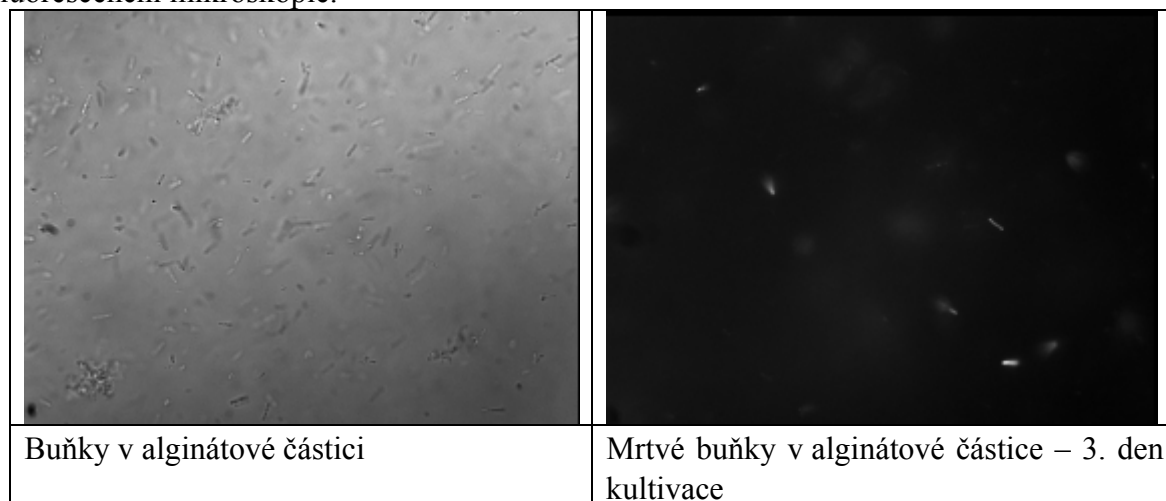
Viabilita buněk enkapsulovaných v částicích byla také stanovena v průběhu sledování jejich stability v modelových podmínkách. Pomocí průtokové cytometrie byla stanovena viabilita enkapsulovaných buněk uchovávaných v 3% kyselině octové po dobu jednoho týdne při teplotě 4°C. Poté byly částice dezintegrovány a uvolněné buňky byly obarveny a stanoveny. Ve všech testovaných typech těchto částic byly i po týdnu stále přítomny pouze živé buňky (viz. obr. 54).



Obr. 54 Porovnání viability buněk *Bifidobacterium breve* v enkapsulovaných preparátech uchovávaných v 3% kyselině octové po dobu jednoho týdne (první pík představuje množství buněk, druhý pík představuje množství živých buněk)

5.3.5 Stanovení viability enkapsulovaných buněk pomocí fluorescenční mikroskopie

Přítomnost živých buněk v enkapsulovaných preparátech byla potvrzena pomocí fluorescenční mikroskopie.



Obr. 55 Porovnání množství všech buněk v enkapsulovaném preparátu s množstvím mrtvých buněk – alginátová částice, 3.den kultivace – 960x zvětšení, vlnová délka 552 nm

Buňky v částici byly pozorovány pod světelným mikroskopem, poté obarveny propidium-jodidem a následně byla sledována fluorescence mrtvých buněk. Srovnáním počtu všech buněk a mrtvých buněk lze tedy vyčíslit zastoupení živých buněk v enkapsulovaném preparátu. Viabilita buněk byla stanovena třetí den kultivace u alginátových částic, tyto částice vykazovaly největší stabilitu a pevnost. Z obrázku 55 je patrné, že preparát obsahoval převážně živé buňky.

Viabilita buněk byla pomocí fluorescenční mikroskopie sledována i v částicích v průběhu stanovení jejich stability v modelových podmínkách. Pomocí průtokové cytometrie byla stanovena viabilita enkapsulovaných buněk uchovávaných v 3% kyselině octové po dobu jednoho měsíce při teplotě 4 °C. Poté byly částice obarveny a vizualizovány pomocí fluorescenční mikroskopie.

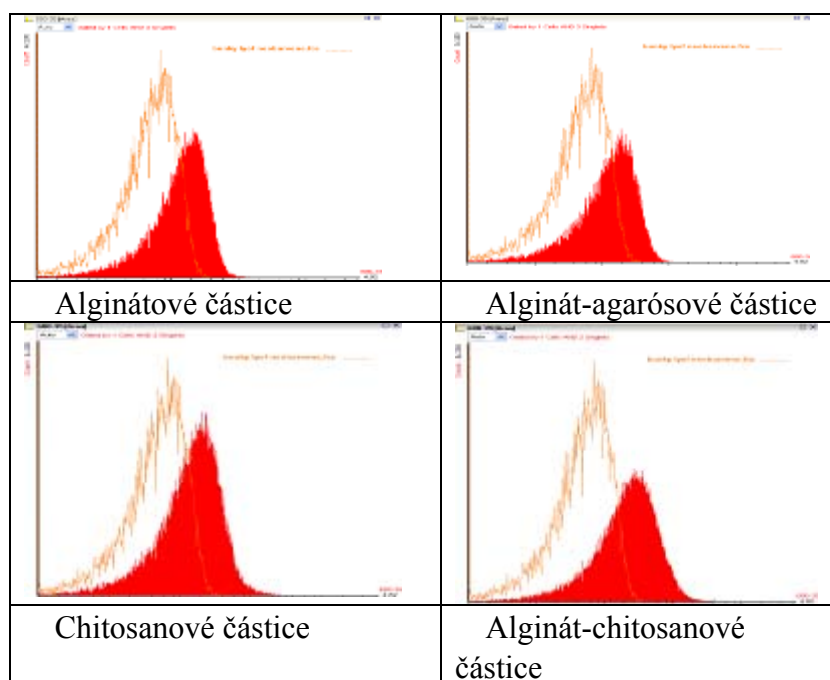
Po 1 měsíci se ve všech typech částic začínaly objevovat mrtvé buňky. Nejvíce mrtvých buněk bylo stanoveno v alginát-pullulanových částicích, naopak nejméně mrtvých buněk obsahovaly alginát-agarosové a alginát-škrobové částice (viz. Příloha 3).

5.3.6 Stanovení stability lyofilizovaných částic

Jako jedna z možností úchovy enkapsulovaných mikroorganismů byla zvolena lyofilizace. Enkapsulované preparáty byly lyofilizovány a uchovány v chladu a suchu po dobu jednoho týdne. Poté byla stanovena viabilita buněk v těchto preparátech a porovnána s neenkapsulovanými lyofilizovanými buňkami mikroorganismu. Stanovení bylo provedeno pomocí průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie s využitím barvení propidium-jodidem. Lyofilizované částice byly dezintegrovány a ponechány ve fyziologickém roztoku několik hodin, uvolněné buňky byly poté obarveny a stanoveny. Ve všech testovaných typech částic byly po lyofilizaci přítomny pouze živé buňky (obr.57).



Obr. 56 Lyofilizované částice s enkapsulovanými mikroorganismy



Obr. 57 Porovnání viability buněk *Bifidobacterium breve* v enkapsulovaných preparátech po lyofilizaci (první pík představuje množství buněk, druhý pík představuje množství živých buněk)

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na enkapsulaci velkých polymerních biomolekul a mikroorganismů. V práci byly enkapsulovány enzymy bromelain, trypsin, pepsin, alkaláza, lipasa a pankreatin. Enkapsulovanými mikroorganismy byly probiotické kmeny *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve*.

Enzymy i mikroorganismy byly enkapsulovány především do polysacharidových částic, u enkapsulace enzymů byly však použity i částice liposomové.

Po enkapsulaci enzymů do vybraných typů částic byla v práci sledována účinnost enkapsulace a stabilita připravených částic. Enkapsulační účinnost byla stanovena z rozdílu koncentrace bílkovin a enzymové aktivity vzorků před a po enkapsulaci. Stabilita částic byla měřena pomocí zeta potenciálu, kdy částice pohybující se mimo interval od -30 mV do 30 mV bylo možné považovat za stabilní. Velikost částic byla měřena na přístroji Zetasizer, pracujícím na principu měření dynamického rozptylu světla. Stabilita všech připravených částic jak u enkapsulovaných enzymů, tak mikroorganismů byla sledována rovněž v modelových fyziologických podmínkách (v uměle žaludeční, pankreatické a žlučové šťávě) a v modelových potravinách.

Za účelem enkapsulace enzymů byly připraveny chitosanové, chitosan-alginátové, alginátové, škrobové a liposomové částice. Enkapsulační účinnost se pohybovala u chitosanových, chitosan-alginátových a liposomových částic u většiny enzymů nad hranicí 50 %. Naopak škrobové a alginátové částice vykazovaly u většiny enzymů enkapsulační účinnost pod 50 %.

Velikost prázdných částic se pohybovala v rozmezí od 248,3 nm do 715,5 nm, přičemž nejmenší velikost byla zjištěna u liposomových částic a největší u chitosan-alginátových částic, které jsou dvojvrstvé.

Z hodnot zeta potenciálu vyplývá, že mezi stabilní částice lze zařadit chitosanové (+33,1 mV) a liposomové částice (-57,7 mV), které vykazovaly výbornou stabilitu. U chitosan-alginátových částic byl naměřen zeta potenciál okolo -30 mV, ovšem po enkapsulaci enzymů došlo k poklesu stability u těchto typů. Alginátové a škrobové částice se pohybovaly v pásu mírné nestability.

Stabilita částic a rychlost usazování byla sledována též pomocí analytické centrifugace. K nejrychlejší sedimentaci docházelo u chitosan-alginátových částic. U chitosanových a škrobových částic nedocházelo k žádné viditelné sedimentaci. Tyto vzorky tedy nebylo možné stanovit měřením změny transmitance, jelikož byly již na počátku centrifugace velmi čiré. U alginátových částic docházelo k sedimentaci a postupné tvorbě agregátů. U liposomových částic docházelo k pozvolné sedimentaci. Z hlediska sedimentační stability a stability částic měřené pomocí zeta potenciálu jsou nejvhodnější pro enkapsulaci enzymů chitosanové a liposomové částice.

Při stanovení stability částic v modelových fyziologických podmínkách bylo stanoveno množství uvolněných bílkovin (enzymů). Všechny částice s enkapsulovanými enzymy byly v žaludeční, pankreatické i žlučové šťávě poměrně stabilní, nedocházelo k výraznějšímu rozpadu částic a uvolnění enzymů do roztoku. Množství uvolněných enzymů z částic působením šťáv nepřesáhlo po dobu inkubace hranice 10 %. V modelových potravinách byly

tyto částice také vcelku stabilní, k výraznému poklesu stability částic nedocházelo ani po týdnu inkubace v simulovaných podmínkách.

Za účelem enkapsulace probiotických mikroorganismů byly připraveny alginátové, chitosanové, chitosan-alginátové, alginát-agarové, alginát-agarosové, alginát-škrobové a alginát-pullulanové částice. U těchto typů částic byla sledována stabilita v modelových potravinách, v modelových fyziologických podmínkách i v kultivačním médiu. Při působení tělních tekutin byl pozorován rozpad chitosanových, alginát-škrobových a alginát-pullulanových částic. Alginát-agarové a alginát-agarosové částice bobtnaly. Větší změny nebyly pozorovány u alginátových a chitosan-alginátových částic.

Při stanovení stability částic v modelových potravinách nedocházelo k výrazným změnám u většiny typů částic ani po měsíci inkubace. Změna byla pozorována pouze u chitosanových částic, kde došlo k mírnému rozpadu částic po 1 měsíci inkubace v 3% kyselině octové.

Při stanovení stability v kultivačním médiu docházelo k výraznějším změnám díky možnosti pronikání živin do částic a růstu mikroorganismů uvnitř částice. Po prvním dni docházelo k rozpadu alginát-škrobových a alginát-pullulanových částic. Po 7 dnech došlo ke změnám pevnosti a tvaru u zbylých typů částic s výjimkou částic chitosanových. U chitosanových částic byla pozorována pouze změna barvy v důsledku nárůstu buněk v částici. Postupně docházelo k uvolňování buněk z připravených částic. Viabilita buněk byla sledována pomocí průtokové cytometrie. Viabilita uvolněných buněk byla srovnatelná s viabilitou buněk bez enkapsulace. Také pomocí fluorescenční mikroskopie bylo potvrzeno, že připravené částice s enkapsulovanými buňkami kultivované v médiu obsahují převážně živé buňky.

Viabilita buněk byla také stanovena v částicích v průběhu sledování jejich stability v modelových podmínkách. Ve všech testovaných typech částic s enkapsulovanými mikroorganismy uchovávaných v kyselé modelové potravině byly i po týdnu stále přítomny pouze živé buňky. Pomocí fluorescenční mikroskopie byla po jednom měsíci v kyselé modelové potravině stanovena přítomnost mrtvých buněk ve všech typech částic. Nejvíce mrtvých buněk bylo stanoveno v alginát-pullulanových částicích, naopak nejméně mrtvých buněk obsahovaly alginát-agarosové a alginát-škrobové částice.

Pro srovnání byla použita jako prostředek k úchově enkapsulovaných mikroorganismů i lyofilizace. Enkapsulované preparáty byly lyofilizovány a následně byla stanovena viabilita buněk. Pomocí průtokové cytometrie bylo potvrzeno, že mikroorganismy v preparátech přežívají a jsou stále vitální.

Závěrem lze konstatovat, že při použití vhodných materiálů lze úspěšně enkapsulovat jak enzymy, tak i probiotické bakterie. Vzniklé částice jsou stabilní po delší dobu a enkapsulované složky si uchovávají svoji aktivitu a životaschopnost. Některé materiály jsou stabilní i v modelovém fyziologickém prostředí a v modelových potravinách, což umožňuje jejich použití pro stabilizaci enkapsulovaných látek a možnost jejich transportu a řízeného uvolnění v trávicí soustavě. Enkapsulace je tedy jednou z perspektivních metod pro produkci kvalitních potravin a potravinových doplňků s vysokou přidanou hodnotou.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] NICOLAAS JAN ZUIDAM, Viktor A. *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* [online]. Online-Ausg. New York: Springer, 2010. ISBN 978-144-1910-080. Dostupné z: http://www.nottingham.ac.uk/ncmh/harding_pdfs/Paper329.pdf
- [2] FANG, Zhongxiang a Bhesh BHANDARI. Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science* [online]. 2010, roč. 21, č. 10, s. 510-523. ISSN 09242244. DOI: 10.1016/j.tifs.2010.08.003. Dostupné z: <http://linkinghub..com/retrieve/pii/S0924224410001925>
- [3] DE VOS, Paul, Marijke M. FAAS, Milica SPASOJEVIC a Jan SIKKEMA. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal* [online]. 2010, roč. 20, č. 4, s. 292-302. ISSN 09586946. DOI: 10.1016/j.idairyj.2009.11.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694609002167>
- [4] DESAI, Kashappa Goud H. a Hyun JIN PARK. Recent Developments in Microencapsulation of Ingredients. *Drying Technology* [online]. 2005, roč. 23, č. 7, s. 1361-1394. ISSN 0737-3937. Dostupné z: <http://pack.korea.ac.kr/non/49.pdf>
- [5] LESMES, Uri a David Julian MCCLEMENTS. Structure-function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery. *Trends in Food Science* [online]. 2009, roč. 20, č. 10, s. 448-457. ISSN 09242244. DOI: 10.1016/j.tifs.2009.05.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224409001782>
- [6] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food* [online]. 2011, roč. 1, s. 1806-1815. ISSN 2211601x. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.265. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X11002665>
- [7] BALASSA, Leslie L., Gene O. FANGER a Otto B. WURZBURG. Microencapsulation in the food industry. *C R C Critical Reviews in Food Technology* [online]. 1971, roč. 2, č. 2, s. 245-265. ISSN 0007-9006. DOI: 10.1080/10408397109527123. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408397109527123>
- [8] ZHAO, Lijuan, Yongkang PAN, Jianguo LI, Guohua CHEN a Arun S. MUJUMDAR. Drying of a Dilute Suspension in a Revolving Flow Fluidized Bed of Inert Particles. *Drying Technology* [online]. 2004-12-31, roč. 22, 1-2, s. 363-376. ISSN 0737-3937. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/DRT-120028240>
- [9] DESAI, Kashappa Goud H. a Hyun JIN PARK. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology* [online]. 2005, roč. 23, č. 7, s. 1361-1394. ISSN 0737-3937. DOI: 10.1081/DRT-200063478. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/DRT-200063478>
- [10] Microencapsulation and the food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft [i.e. und] Technologie. Food Science Technology. Science Technologie Alimentaire*. 1991, roč. 24, č. 4, s. 289-297. ISSN 0023-6438.

- [11] KOPELMAN, I. J., S. MEYDAV a S. WEINBERG. Storage studies of freeze dried lemon crystals. *International Journal of Food Science* [online]. 1977, roč. 12, č. 4, s. 403-410. ISSN 09505423. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1977.tb00122.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.1977.tb00122.x>
- [12] SWARBRICK, James. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 3rd ed. New York: Informa Healthcare, c2007, 6 v. ISBN 08-493-9399-X.
- [13] DÜZGÜNEŞ, Edited by Nejat. *Liposomes*. 1st ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2009. ISBN 978-012-3749-697.
- [14] GREGORIADIS, Gregory. *Liposome Technology*. 3rd ed. New York: Informa Healthcare, c2007-, v. <1-3>. ISBN 97808493972573.
- [15] VELIŠEK, J., HAJŠLOVA, J. *Chemie potravin I*. Vyd. 3. Tabor: OSSIS, 2009, 580 s. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [16] BOATENG, Joshua S., Kerr H. MATTHEWS, Howard N.E. STEVENS a Gillian M. ECCLESTON. Wound healing dressings and drug systems: A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2008, roč. 97, č. 8, s. 2892-2923. ISSN 00223549. DOI: 10.1002/jps.21210. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jps.21210>
- [17] ZIMMERMANN, Heiko, Stephen G. SHIRLEY a Ulrich ZIMMERMANN. Alginate- based encapsulation of cells: Past, present, and future. *Current Reports* [online]. 2007, roč. 7, č. 4, s. 314-320. ISSN 1534-4827. DOI: 10.1007/s11892-007-0051-1. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11892-007-0051-1>
- [18] SINHA, V.R, A.K SINGLA, S WADHAWAN, R KAUSHIK, R KUMRIA, K BANSAL a S DHAWAN. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2004, roč. 274, 1-2, s. 1-33. ISSN 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2003.12.026. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve>
- [19] DUSTGANI, Amir, Ebrahim Vasheghani FARAHANI a Mohammad IMANI. Preparation of Chitosan Nanoparticles Loaded by Dexamethasone Sodium Phosphate. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2008, č. 4, s. 111-114. Dostupné z: http://www.sid.ir/En/VEWSSID/J_pdf/106720080201.pdf
- [20] MARINHO-SORIANO, E. Agar polysaccharides from Gracilaria species (Rhodophyta, Gracilariaceae). *Journal of Biotechnology* [online]. 2001, roč. 89, č. 1, s. 81-84. ISSN 01681656. DOI: 10.1016/S0168-1656(01)00255-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165601002553>
- [21] LAM, Pik-Ling, Stanton Hon-Lung KOK, Yiu-Wah HO, Raymond Siu-Ming WONG, Gregory Yin-Ming CHENG, Chor-Hing CHENG, Kim-Hung LAM, Roberto GAMBARI, Kenneth Ka-Ho LEE a Chung-Hin CHUI. A novel green gelatin-agar microencapsulation system with *P. urinaria* as an improved anti-*A. niger* model. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2013, roč. 92, č. 1, s. 877-880. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.09.080. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861712009988>
- [22] VOET, Donald. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 1325 s. ISBN 80-856-0544-9.

- [23] YAN, Yan, Zhibing ZHANG, Jason. R. STOKES, Qing-Zhu ZHOU, Guang-Hui MA a Michael J. ADAMS. Mechanical characterization of agarose micro-particles with a narrow size distribution. *Powder Technology* [online]. 2009, roč. 192, č. 1, s. 122-130. ISSN 00325910. DOI: 10.1016/j.powtec.2008.12.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032591008005779>
- [24] ELLIS, A. a J.C. JACQUIER. Manufacture and characterisation of agarose microparticles. *Journal of Food Engineering* [online]. 2009, roč. 90, č. 2, s. 141-145. ISSN 02608774. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2008.05.036. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877408002744>
- [25] SHI, Ai-min, Dong LI, Li-jun WANG, Yu-guang ZHOU a Benu ADHIKARI. Spray drying of starch submicron particles prepared by high pressure homogenization and mini-emulsion cross-linking. *Journal of Food Engineering* [online]. 2012, roč. 113, č. 3, s. 399-407. ISSN 02608774. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2012.06.017. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877412003135>
- [26] LAVOINE, Nathalie, Isabelle DESLOGES, Alain DUFRESNE a Julien BRAS. Microfibrillated cellulose - Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2012, roč. 90, č. 2, s. 735-764. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014486171200447X>
- [27] HEINZE, T a T LIEBERT. Unconventional methods in cellulose functionalization. *Progress in Polymer Science* [online]. 2001, roč. 26, č. 9, s. 1689-1762. ISSN 00796700. DOI: 10.1016/S0079-6700(01)00022-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670001000223>
- [28] JEGANNATHAN, Kenthorai Raman, Eng-Seng CHAN a Pogaku RAVINDRA. Physical and stability characteristics of Burkholderia cepacia lipase encapsulated in κ -carrageenan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* [online]. 2009, roč. 58, 1-4, s. 78-83. ISSN 13811177. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381117708002397>
- [29] BRIONES, Annabelle V. a Toshinori SATO. Encapsulation of glucose oxidase (GOD) in polyelectrolyte complexes of chitosan and carrageenan. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2010, roč. 70, č. 1, s. 19-27. ISSN 13815148. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2009.09.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381514809001813>
- [30] BELYAEVA, Evgeniya, Dominique DELLA VALLE a Denis PONCELET. Immobilization of α -chymotrypsin in κ -carrageenan beads prepared with the static mixer. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2004, roč. 34, č. 2, s. 108-113. ISSN 01410229. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2003.07.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014102290300303X>
- [31] CASSIDY, M.B., K.T. LEUNG, H. LEE a J.T. TREVORS. Survival of lac-lux marked *Pseudomonas aeruginosa* UG2Lr cells encapsulated in κ -carrageenan and alginate. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 1995, roč. 23, č. 3, s. 281-290 [cit. 2013-04-06]. ISSN 01677012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016770129500038M>

- [32] FALSHAW, Ruth, Harris J BIXLER a Kevin JOHNDRO. Structure and performance of commercial Î²-2 carrageenan extracts. Part III. Structure analysis and performance in two dairy applications of extracts from the New Zealand red seaweed, *Gigartina atropurpurea*. *Food Hydrocolloids* [online]. 2003, roč. 17, č. 2, s. 129-139. ISSN 0268005x. DOI: 10.1016/S0268-005X(02)00045-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X02000450>
- [33] PRAJAPATI, Vipul D., Girish K. JANI a Simin M. KHANDA. Pullulan: An exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2013, roč. 95, č. 1, s. 540-549. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.02.082. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861713002580>
- [34] GUPTA, Mona a Ajay Kumar GUPTA. Hydrogel pullulan nanoparticles encapsulating pBUDLacZ plasmid as an efficient gene delivery carrier. *Journal of Controlled Release* [online]. 2004, roč. 99, č. 1, s. 157-166. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2004.06.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365904002925>
- [35] GÃMEZ-GUILLÃN, M.C., B. GIMÃNEZ, M.E. LÃPEZ-CABALLERO a M.P. MONTERO. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids* [online]. 2011, roč. 25, č. 8, s. 1813-1827. ISSN 0268005x. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2011.02.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X11000427>
- [36] SOUZA, Flavia N., Clarice GEBARA, Maria C.E. RIBEIRO, Karina S. CHAVES, Mirna L. GIGANTE a Carlos R.F. GROSSO. Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. *Food Research International* [online]. 2012, roč. 49, č. 1, s. 560-566. ISSN 09639969. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.07.041. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996912002852>
- [37] FERNANDES, Gabriel D., Rosana M. ALBERICI, Gustavo G. PEREIRA, Elaine C. CABRAL, Marcos N. EBERLIN a Daniel BARRERA-ARELLANO. Direct characterization of commercial lecithins by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry* [online]. 2012, roč. 135, č. 3, s. 1855-1860. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461201045X>
- [38] LU, Xuemin, Qinghua LU, Zikang ZHU, Jie YIN a Zongguang WANG. Laser induced periodic structure on lecithin-doped polyimide film surface and its ability to align liquid crystal molecules. *Polymer* [online]. 2003, roč. 44, č. 16, s. 4501-4507. ISSN 00323861. DOI: 10.1016/S0032-3861(03)00433-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386103004336>
- [39] ULUDAG, Hasan, Paul DE VOS a Patrick A TRESKO. Technology of mammalian cell encapsulation. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2000, roč. 42, 1-2, s. 29-64. ISSN 0169409x. DOI: 10.1016/S0169-409X(00)00053-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X00000533>

- [40] SCHEFFER, Luana, Inna SOLOMONOV, Markus JAN WEYGAND, Kristian KJAER, Leslie LEISEROWITZ a Lia ADDADI. Structure of Cholesterol/Ceramide Monolayer Mixtures: Implications to the Molecular Organization of Lipid Rafts. *Biophysical Journal* [online]. 2005, roč. 88, č. 5, s. 3381-3391. ISSN 00063495. DOI: 10.1529/biophysj.104.051870. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349505733877>
- [41] DUCHÁČEK, Vratislav. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006, 278 s. ISBN 80-708-0617-6.
- [42] ZHANG, Li-sheng, Wei-zhong WU a Jian-long WANG. Immobilization of activated sludge using improved polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Journal of Environmental Sciences* [online]. 2007, roč. 19, č. 11, s. 1293-1297. ISSN 10010742. DOI: 10.1016/S1001-0742(07)60211-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1001074207602113>
- [43] UHLICH, Thomas, Mathias ULBRICHT a Georg TOMASCHEWSKI. Immobilization of enzymes in photochemically cross-linked polyvinyl alcohol. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 1996, roč. 19, č. 2, s. 124-131. ISSN 01410229. DOI: 10.1016/0141-0229(95)00190-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0141022995001905>
- [44] MING YANG, Jen a Hsien CHIH CHIU. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol/chitosan blended membrane for alkaline direct methanol fuel cells. *Journal of Membrane Science* [online]. 2012, 419-420, s. 65-71. ISSN 03767388. DOI: 10.1016/j.memsci.2012.06.051. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037673881200511X>
- [45] BURGAIN, J., C. GAIANI, M. LINDER a J. SCHER. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering* [online]. 2011, roč. 104, č. 4, s. 467-483. ISSN 02608774. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S026087741000631X>
- [46] KAILASAPATHY, Kaila a James CHIN. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology* [online]. 2000-02-15, roč. 78, č. 1, s. 80-88. ISSN 0818-9641. DOI: 10.1046/j.1440-1711.2000.00886.x. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1046/j.1440-1711.2000.00886.x>
- [47] SULTANA, Khalida, Georgia GODWARD, N REYNOLDS, R ARUMUGASWAMY, P PEIRIS a Kaila KAILASAPATHY. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2000, roč. 62, 1-2, s. 47-55. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160500003809>
- [48] KRAJEWSKA, Barbara. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2004, roč. 35, 2-3, s. 126-139. ISSN 01410229. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022904001231>

- [49] KRÁLOVÁ, Blanka, Ladislav FUKAL, Pavel RAUCH a Tomáš RUMIL. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.
- [50] GUISAN, Jose M. *Immobilization of enzymes and cells*. 2nd ed. Totowa, N.J.: Humana Press, c2006, xiv, 449 p. ISBN 978-158-8292-902.
- [51] HRČKOVÁ, Martina, Ernest ŠTURDÍK, Tibor MALIAR a Jaroslav ZEMANOVIČ. Biochemické vlastnosti proteolytických enzymů. *Chemické listy*. 2004, č. 98, s. 842-850. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_09_04.pdf
- [52] VODRÁŽKA, Zdeněk, Jan KÁŠ a Pavel RAUCH. *Enzymologie*. 3. přeprac. vyd. Praha: VŠCHT, 1998, 171 s. ISBN 80-708-0330-4.
- [53] KREJSEK, Jan, Manuela KUDLOVÁ a Martina KOLÁČKOVÁ. Nutrice, probiotika a imunitní systém II. část: Nutrice, přirozená slizniční mikroflóra a individuální imunitní reaktivita. *Pediatric pro praxi*, 2007, roč. 8, č. 3, s. 126-127. Dostupné z: www.pediatricpropraxi.cz
- [54] Particle size distribution. In: *Malvern* [online]. © 2013. Dostupné z: www.malvern.co.uk
- [55] Zeta potential theory. In: *NBTC* [online]. [2010]. Dostupné z: <http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zetasizer%20chapter%2016.pdf>
- [56] *HPLC* [online]. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. Dostupné z WWW: <http://www.vscht.cz/tmt/studium/LOTP/LOTP_09_emulse.pdf>.
- [57] Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/charakterizace-disperznich-soustav-pomoci-analyticke-odstredivky> [online].
- [58] ORMEROD, Michael G. Flow Cytometry. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine* [online]. 2006. DOI: 10.1002/3527600906.mcb.200300144. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1002/3527600906.mcb.200300144>
- [59] SHAPIRO, Howard M. *Practical flow cytometry* [online]. 4th ed. New York: Wiley-Liss, c2003 [cit. 2013-03-16]. ISBN 0-471-41125-6.
- [60] Průtoková cytometrie. In: *Biofyzikální ústav* [online]. 19.2.2013 [cit. 2013-03-16]. Dostupné z: http://www.med.muni.cz/biofyz/files/gerontologie/prutokova_cytometrie_prezentace.ppt
- [61] BRANSKÁ, Barbora, Michaela LINHOVÁ, Petra PATÁKOVÁ, Leona PAULOVÁ a Karel MELZOCH. Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy. *Chemické Listy* [online]. 2011, č. 105, s. 586-593. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_586-593.pdf
- [62] LI, Ping, Ya-Ni DAI, Jun-Ping ZHANG, Ai-Qin WANG a Qin WEI. Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine. *International Journal of Biomedical Science* [online]. 2008, roč. 4, č. 3, s. 221-228. Dostupné z: <http://www.ijbs.org/user/ContentFullText.aspx?VolumeNO=4&StartPage=221&Type=pdf>

- [63] CHIN, Suk Fun, Suh Cem PANG a Soon Hiang TAY. Size controlled synthesis of starch nanoparticles by a simple nanoprecipitation method. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2011, roč. 86, č. 4, s. 1817-1819. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.07.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861711005881>
- [64] MÁROVÁ, Ivana a Dana VRÁNOVÁ. *Praktikum z biochemie*. Ústav chemie potravin a biotechnologií FCH VUT v Brně: Fakulta chemická VUT v Brně, 2002.
- [65] MORITA, Y., Q. HASAN, T. SAKAGUCHI, Y. MURAKAMI, K. YOKOYAMA a E. TAMIYA. Properties of a cold-active protease from psychrotrophic *Flavobacterium balustinum* P104. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 1998-12-16, roč. 50, č. 6, s. 669-675. ISSN 0175-7598. DOI: 10.1007/s002530051349. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530051349>
- [66] *Československý lékopis: Pharmacopoea Bohemoslovaca*. 4. vyd. Praha: Avicenum, 1987
- [67] Vyhláška č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů. ČR, 2000. Dostupné z: <http://portal.gov.cz/app/zakony/zakonPar.jsp?idBiblio=49577&fulltext=&nr=258~2F2000&part=&name=&rpp=15#local-content>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CH	chitosanové částice
CHA	chitosan-alginátové částice
A	alginátové částice
L	liposomové částice
Š	škrobové částice
ŽALŠ	žaludeční šťáva
ŽŠ	žlučová šťáva
PŠ	pankreatická šťáva
Pankr.	pankreatin
Brom.	bromelain
MO	mikroorganismus
DLS	dynamic light scattering

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 – Kalibrační přímka pro stanovení bílkovin

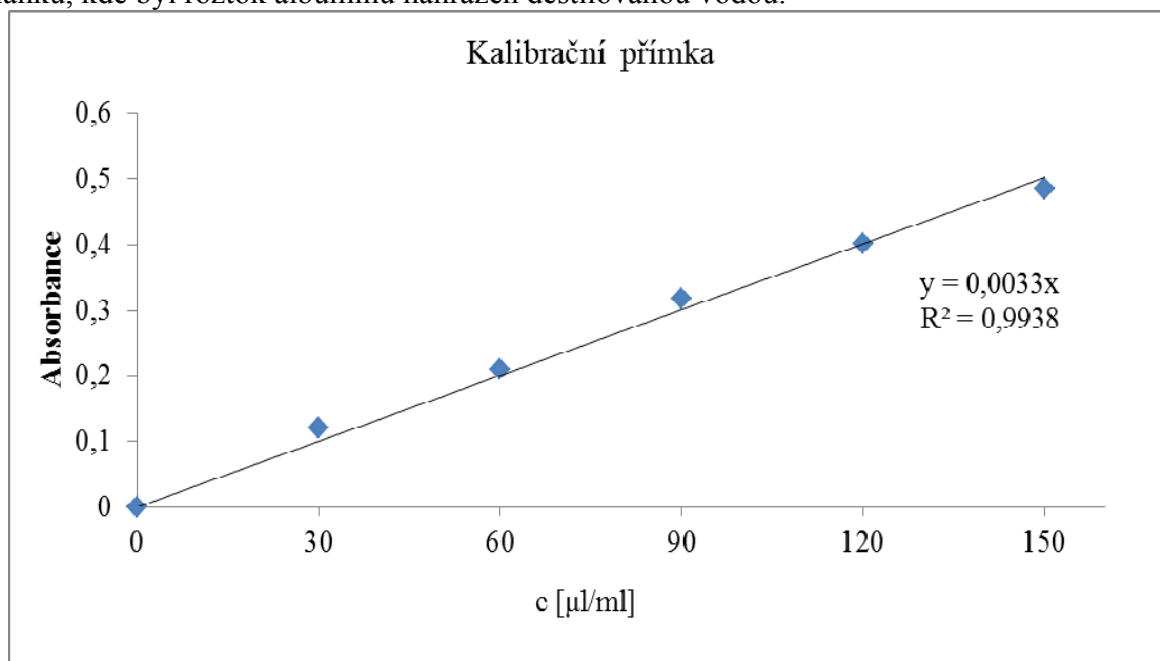
Příloha 2 – Vizualizace částic pomocí optického mikroskopu

Příloha 3 – Vizualizace částic pomocí fluorescenčního mikroskopu

9 PŘÍLOHY

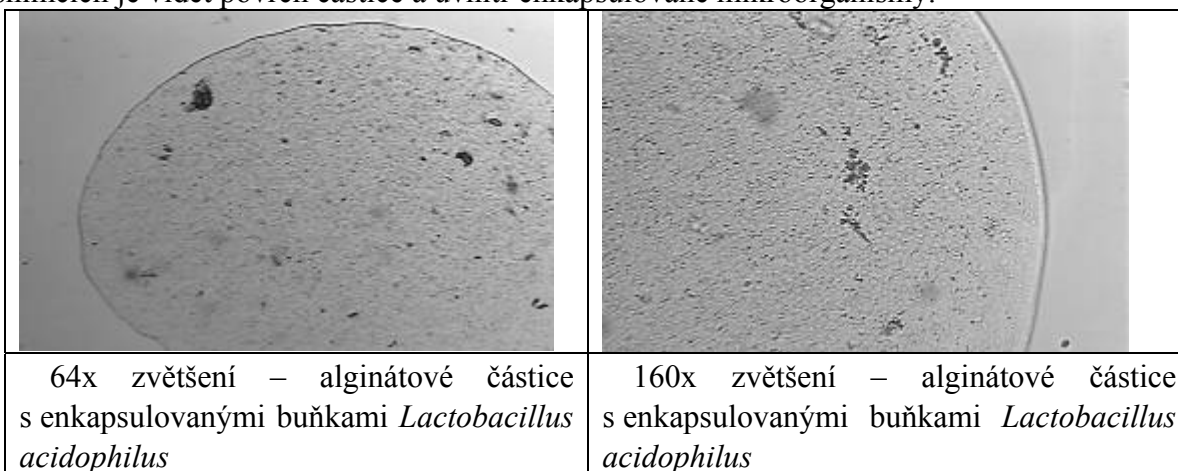
Příloha 1 – Kalibrační přímka pro stanovení bílkovin

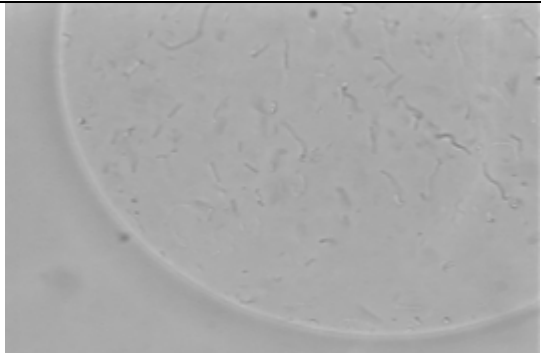
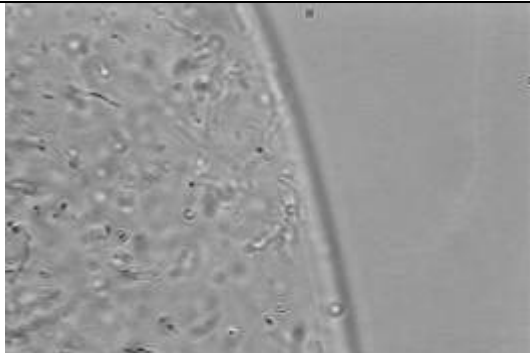
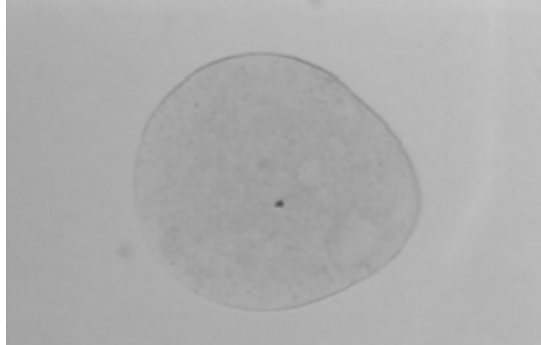
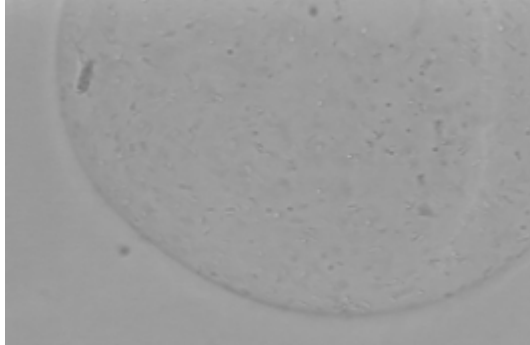
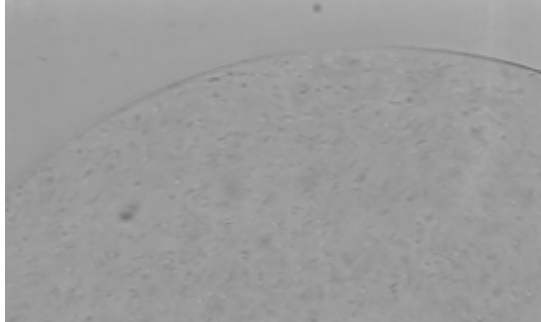
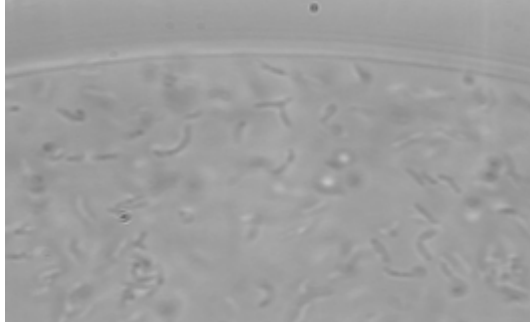
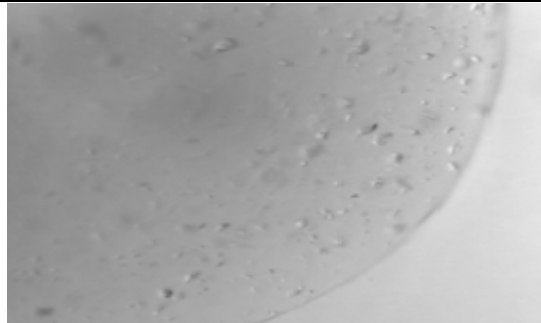
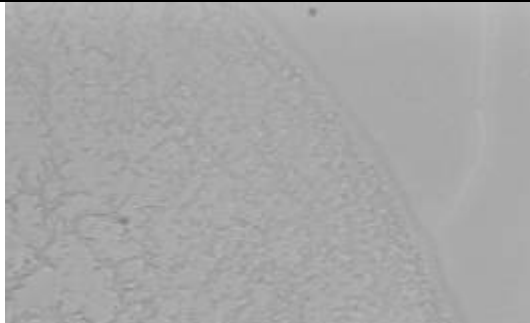
Pro sestavení kalibrační křivky byl použit roztok albuminu, z něhož byla připravena kalibrační řada o koncentraci 0,15 až 0,75 mg/ml. Absorbance byla změřena při 650 nm proti blanku, kde byl roztok albuminu nahrazen destilovanou vodou.


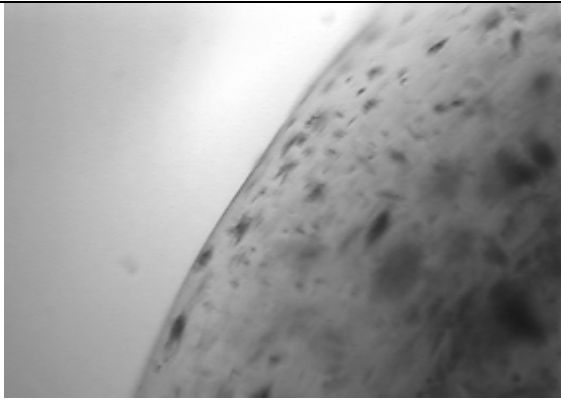
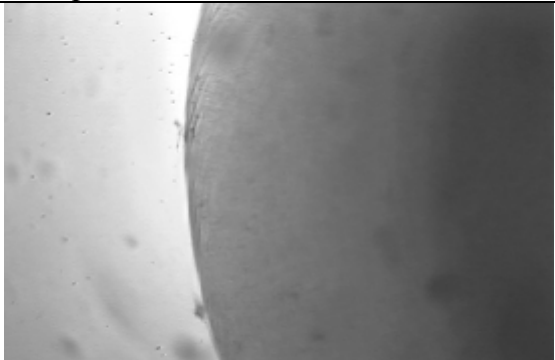
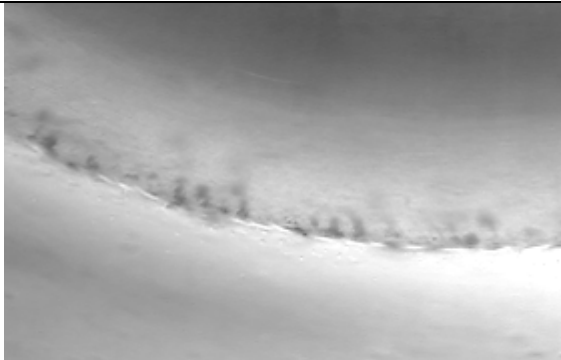
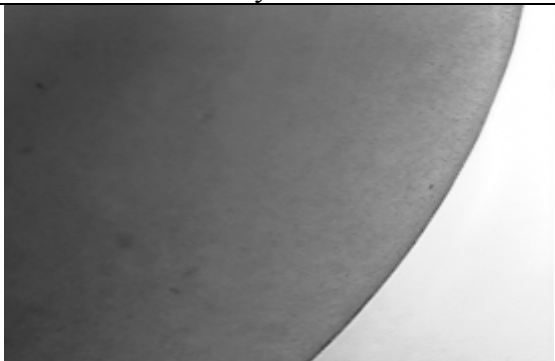
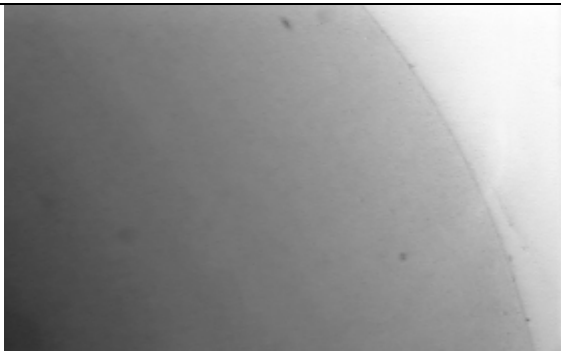
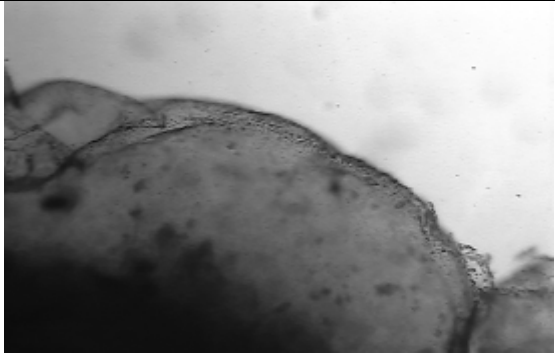
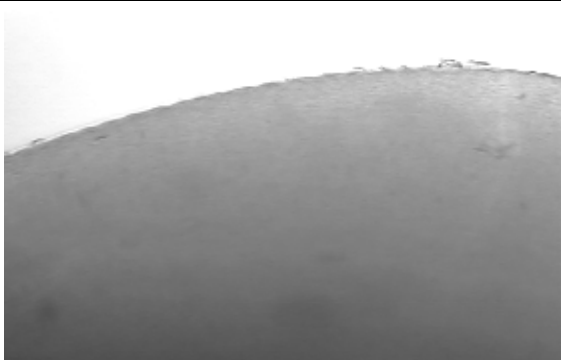


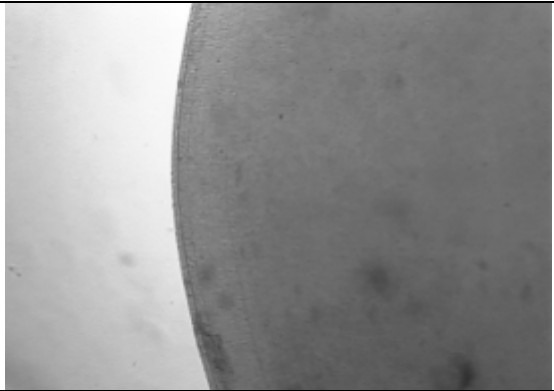

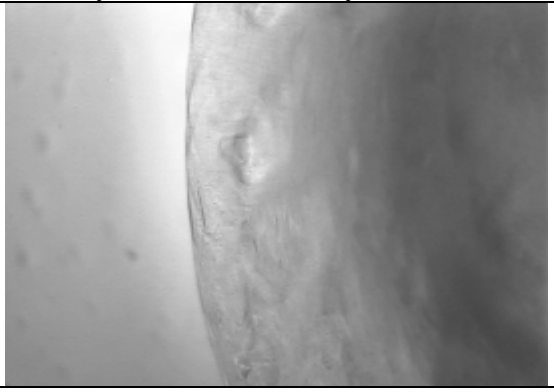
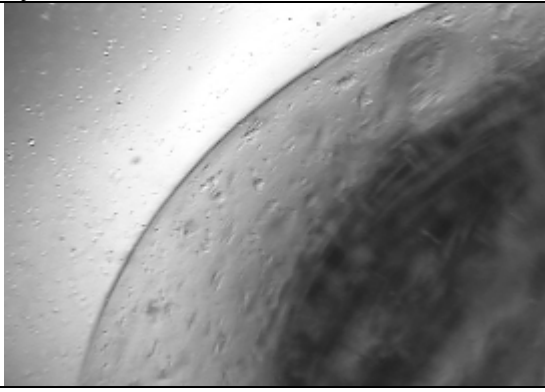
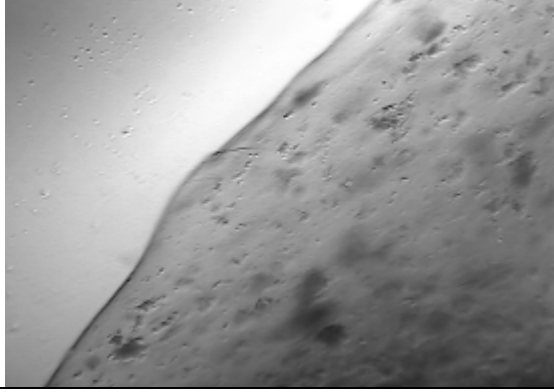
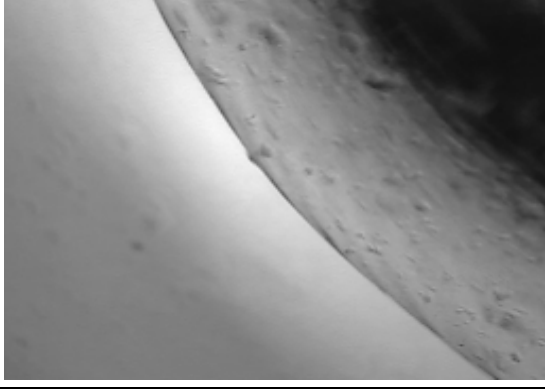
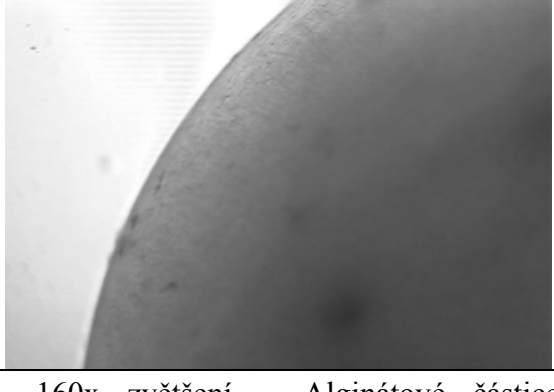
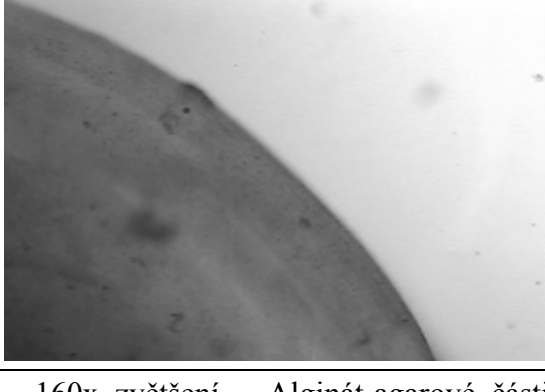
Příloha 2 – Vizualizace částic pomocí optického mikroskopu

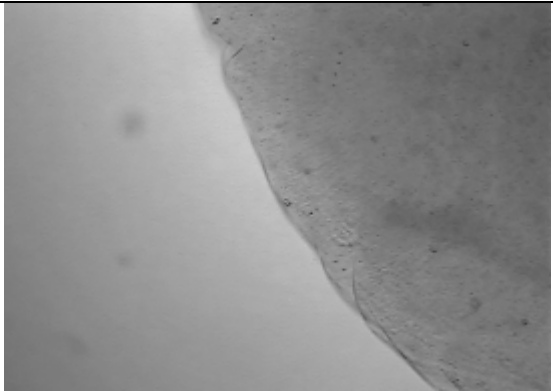
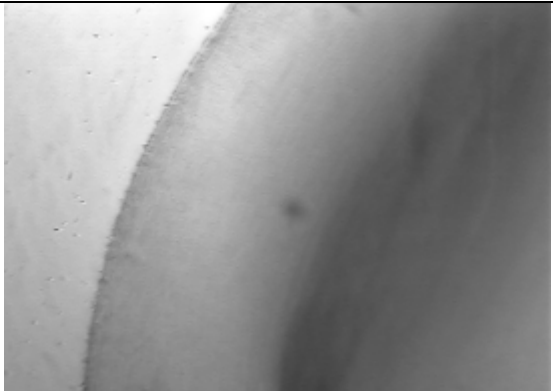
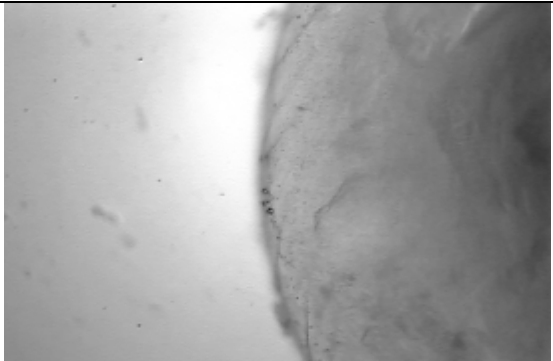
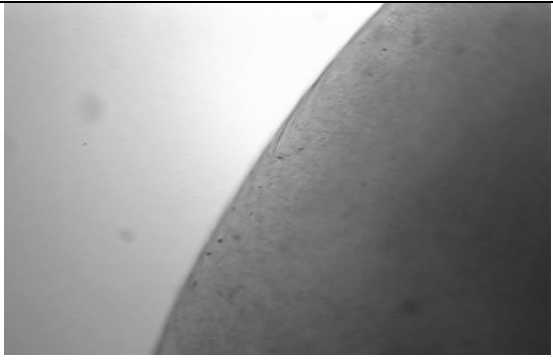
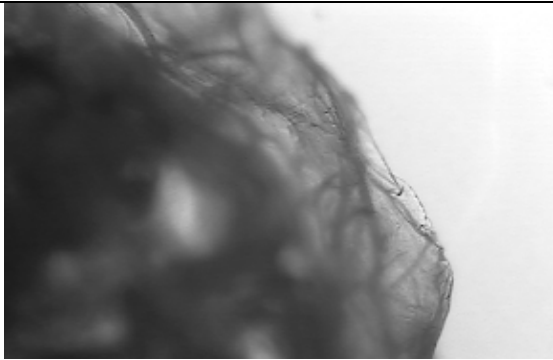
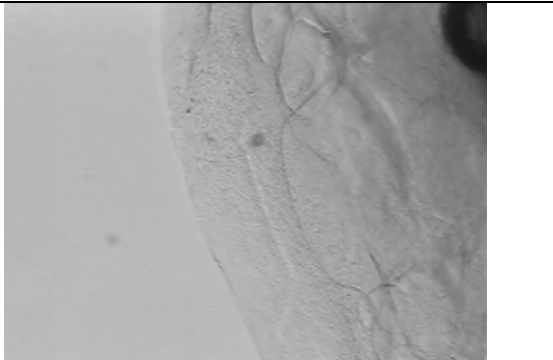
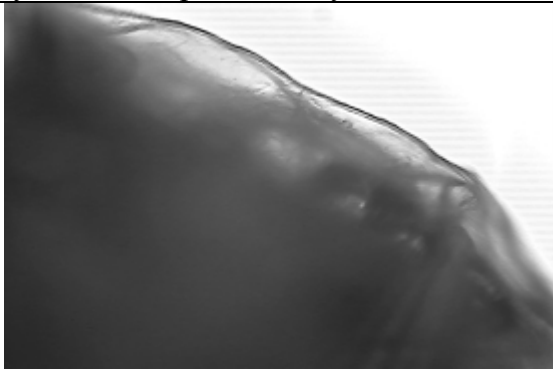
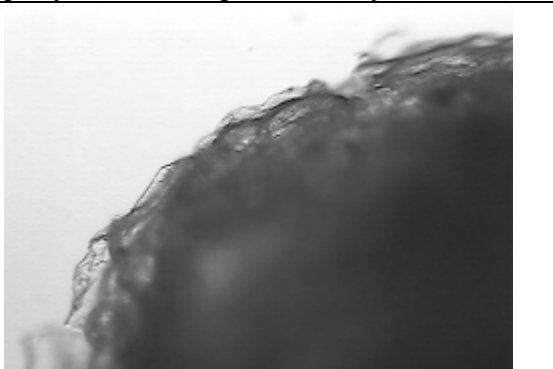
Pomocí optické mikroskopie byly zobrazeny částice s enkapsulovanými bakteriemi. Na snímcích je vidět povrch částice a uvnitř enkapsulované mikroorganismy.



	
640x zvětšení – alginátové částice s enkapsulovanými buňkami <i>Lactobacillus acidophilus</i>	1600x zvětšení – alginátové částice s enkapsulovanými buňkami <i>Lactobacillus acidophilus</i>
	
160x zvětšení – alginátové částice s enkapsulovanými buňkami <i>Bifidobacterium breve</i>	640x zvětšení – alginátové částice s enkapsulovanými buňkami <i>Bifidobacterium breve</i>
	
640x zvětšení – alginátové částice s enkapsulovanými buňkami <i>Bifidobacterium breve</i>	1600x zvětšení – alginátové částice s enkapsulovanými buňkami <i>Bifidobacterium breve</i>
	
160x zvětšení – alginát-škrobové částice	640x zvětšení – alginát-chitosan-alginátové částice s enkapsulovanými buňkami <i>Lactobacillus acidophilus</i>

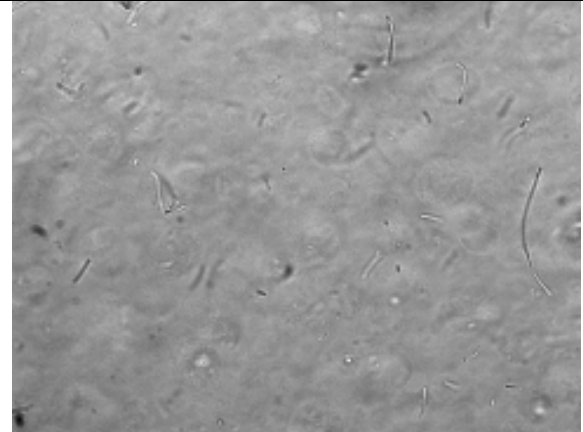
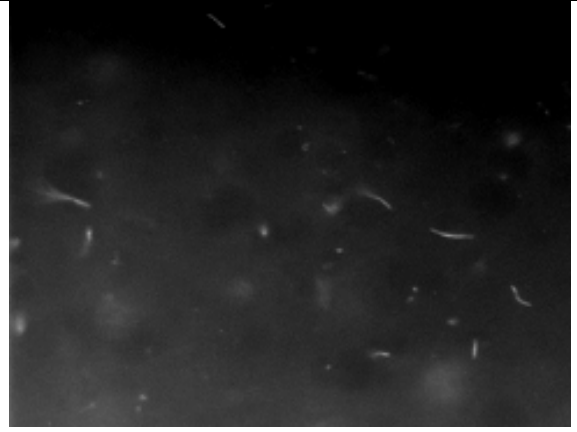
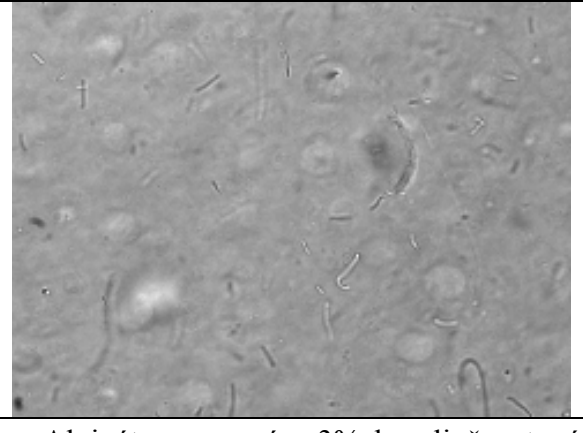

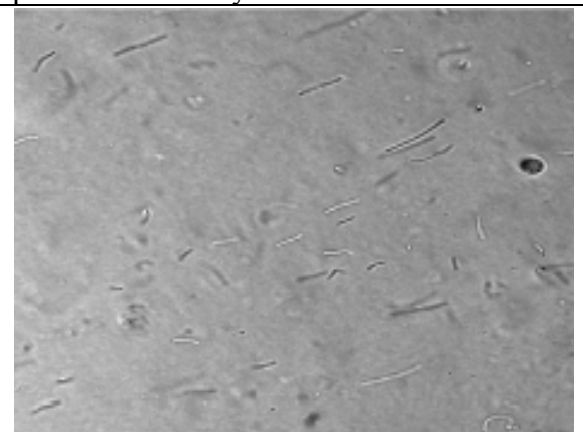
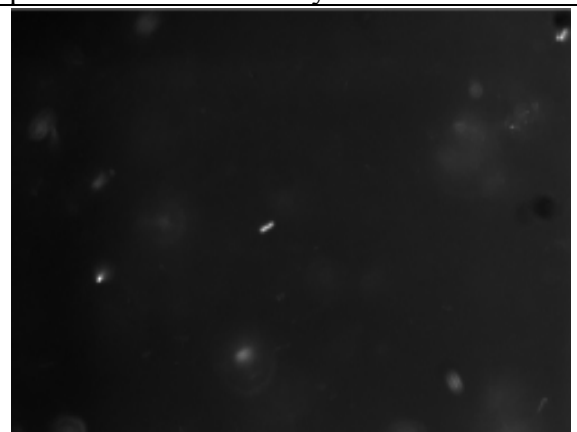
	
160x zvětšení – agarosové částice s enkapsulovanými buňkami <i>Lactobacillus acidophilus</i>	160x zvětšení – Alginát-pullulanové částice ve vodě
	
160x zvětšení – Alginátové částice v 10% etanolu – 1 týden	160x zvětšení – Alginátové částice v 10% etanolu – 1 měsíc
	
160x zvětšení – Alginátové částice v 3% kyselině octové – 1 týden	160x zvětšení – Alginátové částice v 3% kyselině octové – 1 měsíc
	
160x zvětšení – Alginát-agarové částice v 10% etanolu – 1 měsíc	160x zvětšení – Alginátové částice v 50% tuku – 1 měsíc


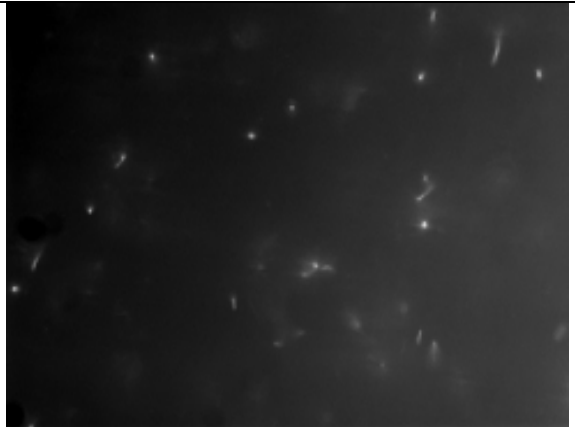
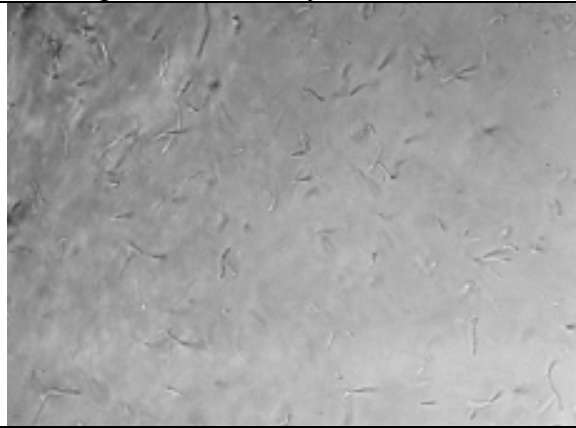
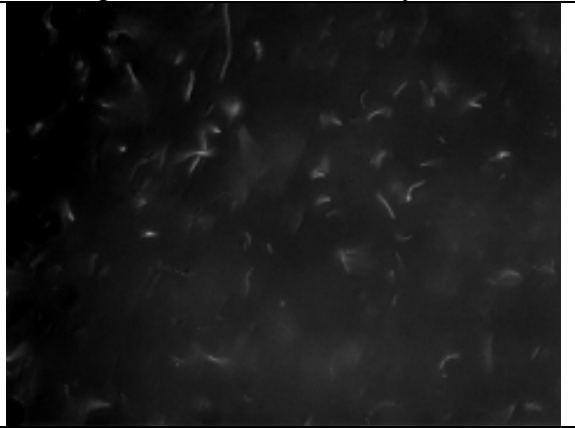
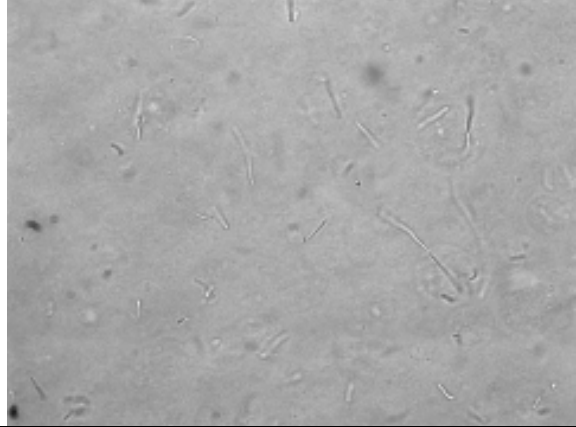
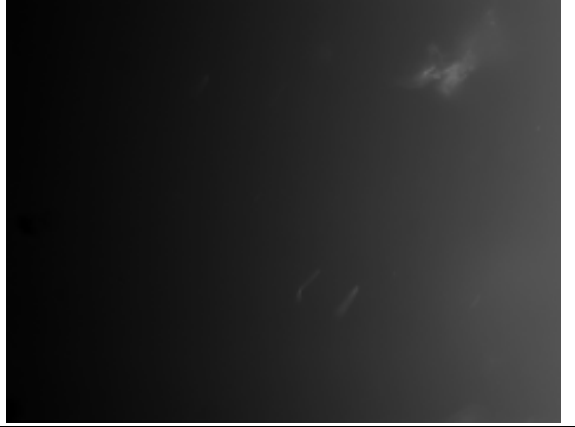
	
160x zvětšení – Alginát-agarové částice v 3% kyselině octové – 1 týden	160x zvětšení – Alginát-agarové v 3% kyselině octové – 1 měsíc
	
160x zvětšení – Alginát-pullulanové částice v 10% etanolu – 1 týden	160x zvětšení – Alginát- pullulanové částice v 3% kyselině octové – 1 týden
	
160x zvětšení – Alginát- škrobové v 3% kyselině octové – 1 měsíc	160x zvětšení – Alginát-škrobové částice v 10% etanolu – 1 týden
	
160x zvětšení – Alginátové částice v médiu	160x zvětšení – Alginát-agarové částice v médiu

	
160x zvětšení – Alginát-agarosové částice v médiu	160x zvětšení – Alginát-chitosanové částice v médiu
	
160x zvětšení – chitosanové částice v médiu	160x zvětšení – Alginát-agarosové částice ve vodě
	
160x zvětšení – Alginátové částice po lyofilizaci a opětovném hydratování	160x zvětšení – Alginát-agarosové částice po lyofilizaci a opětovném hydratování
	
160x zvětšení – Alginát-chitosanové částice po lyofilizaci a opětovném hydratování	160x zvětšení – Chitosanové částice po lyofilizaci a opětovném hydratování

Příloha 3 – Vizualizace částic pomocí fluorescenčního mikroskopu

Vizualizace částic byla provedena pomocí fluorescenčního mikroskopu (Olympus, SRN) při zvětšení 960x a vlnové délce 552 nm.

	
Alginát v 3% kyselině octové po měsíci – buňky	Alginát v 3% kyselině octové po měsíci – mrtvé buňky
	
Alginát-agarosové v 3% kyselině octové po měsíci – buňky	Alginát-agarosové v 3% kyselině octové po měsíci – mrtvé buňky
	
Alginát-agarové v 3% kyselině octové po měsíci – buňky	Alginát-agarové v 3% kyselině octové po měsíci mrtvé buňky

	
Alginát-Chitosanové v 3% kyselině octové po měsíci- buňky	Alginát-Chitosanové v 3% kyselině octové po měsíci – mrtvé buňky
	
Alginát-pullulanové v 3% kyselině octové po měsíci – buňky	Alginát-pullulanové v 3% kyselině octové po měsíci – mrtvé buňky
	
Alginát-škrobové v 3% kyselině octové po měsíci – buňky	Alginát-škrobové v 3% kyselině octové po měsíci – mrtvé buňky